

Project 505.0100

Ontwikkeling analysemethoden voor micronutriënten

Projectleider: ir P.C.H. Hollman

Rapport 90.15

Januari 1990

De simultane bepaling van vitamine  
B<sub>1</sub> en vitamine B<sub>2</sub> in voedingsmidde-  
len met behulp van HPLC

J.H. Slangen

Medewerkers: H.M. van der Struijs-van de Putte, H.C.H. Kleijnen

Goedgekeurd door: ir P.C.H. Hollman

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-19110

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1990, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouw-  
produkten.

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermel-  
ding.

#### VERZENDLIJST

##### INTERN:

directeur

sectorhoofden

programmabeheer en informatieverzorging

J.H. Slangen

ir P.C.H. Hollman

afdeling Micronutriënten en Natuurlijke Toxische Stoffen (5x)

circulatie

bibliotheek

##### EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Wetenschap en Technologie

Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden

Ware(n) Chemicus

Regionale Inspectie Gezondheidsbescherming Maastricht (ir H. Roomans)

CIVO/TNO Zeist (dr J. Schrijver)

Landbouwuniversiteit Wageningen, Vakgroep Humane Voeding (prof. dr

M.B. Katan)

Agralin

## ABSTRACT

De simultane bepaling van vitamine B<sub>1</sub> en vitamine B<sub>2</sub> in voedingsmiddelen met behulp van HPLC.

Simultaneous determination of vitamin B<sub>1</sub> and vitamin B<sub>2</sub> in foods by HPLC (in Dutch)

Report 90.15      January 1990

J.H. Slangen, P.C.H. Hollman

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)  
P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands

2 figures, 13 tables, 7 appendices

An ion-pair liquid chromatographic method coupled with fluorometric detection for the simultaneous determination of vitamin B<sub>1</sub> (thiamin) and vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin) in various food matrices is described. The method involves extraction of the vitamins by autoclaving with sulphuric acid, followed by enzymatic hydrolysis of phosphorylated vitamins with Takadiastase. The vitamins are separated isocratically on a C<sub>18</sub> reversed phase column with methanol/water containing a phosphate buffer and n-heptanesulfonic acid as counterion. Vitamin B<sub>2</sub> is quantitated by fluorescence detection, vitamin B<sub>1</sub> is quantitated by a second fluorescence detector after post-column derivatization to the fluorescent thiochrome. Coefficients of variation (CV) of the method are 2,4% for vitamin B<sub>1</sub> and 2,7% for vitamin B<sub>2</sub>.

Recoveries of vitamins added to 20 different foods are as follows: thiaminchlorid 101+/-10.6%, thiaminmonophosphate 99+/-7.6%, riboflavin 106+/-7.0% and riboflavinmonophosphate 86+/-6.7%.

Keywords: HPLC, vitamins, vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, thiamin, riboflavin, thiaminmonophosphate, riboflavinmonophosphate, fluorescence detection, determination, foods

( )

( )



INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 CHROMATOGRAFIE	8
2.1 Inleidende experimenten	8
2.1.1 Post-column reactor	10
2.1.2 Volume monstervloeistof vials	12
2.1.3 Stabilisering chromatografisch systeem	14
2.2 Flexibiliteit chromatografisch systeem	15
2.2.1 Methanolconcentratie eluens	15
2.2.2 Tegenionconcentratie eluens	16
3 EXTRACTIE	17
3.1 Enzymatische hydrolyse	18
3.2 Autoclaafontsluiting	20
4 TOEPASSING ANALYSEMETHODE	20
5 STANDAARDEN	25
5.1 Zuiverheid	25
5.1.1 Zuiverheid riboflavine	26
5.1.2 Zuiverheid riboflavinemonofosfaat	28
5.1.3 Zuiverheid thiamine	29
5.1.4 Zuiverheid thiaminemonofosfaat	30
5.2 Houdbaarheid stock- en werkoplossingen standaarden	31
5.3 Procedure en criteria voor de standaardoplossingen	33
6 CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN	34
7 LITERATUUR	36
BIJLAGEN	
A Invloed methanol- en tegenionconcentratie op de retentietijden van riboflavine, riboflavinemonofosfaat, thiamine en thiaminemonofosfaat	
B Chromatogrammen van de standaarden riboflavine en riboflavinemonofosfaat met en zonder autoclaafbehandeling	
C Analysevoorschrift voor de simultane bepaling van riboflavine en thiamine in voedingsmidellen	
D Chromatogrammen van een aantal onderzochte produkten bij de bepaling van riboflavine en thiamine en van produkten met storende componenten voor de bepaling van thiamine	
E Absorptiespectrum van riboflavine en riboflavinemonofosfaat	
F Absorptiespectrum thiamine en thiaminemonofosfaat	
G Absorptiespectrum riboflavine na 2 jaar bewaring van de stock-oplossing	

( )

( )

## SAMENVATTING

Dit rapport geeft een overzicht van de tot standkoming van een simultane analysemethode voor thiaminechloride en riboflavine in voedingsmiddelen. De methode is gebaseerd op autoclaafontsluiting met zwavelzuur van de monstermatrix, omzetting van de fosforzure esters van beide vitamines met behulp van het enzym Takadiastase in de vrije vorm en scheiding van de vitamines met behulp van ion-paar chromatografie met HPLC. Riboflavine wordt gemeten aan de hand van de eigen fluorescentie, thiaminechloride wordt on-line gederivatiseerd tot thiochroom en vervolgens eveneens fluorimetrisch gemeten.

De invloed van de methanolconcentratie en de tegenionconcentratie (n-heptaansulfonzuur) in het eluens op de retentie van de vitamines is onderzocht. De problemen die optraden bij de post-columnderivatisering van thiaminechloride zijn omschreven en opgelost. Het totale chromatografisch systeem is stabiel en betrouwbaar gebleken tijdens de analyse van ca tweehonderd monsters.

De stabiliteit van de standaarden van de vitamines en de esters van beide is onderzocht gedurende de autoclaafontsluiting en de daaropvolgende enzymatische defosforylisering tot de vrije vorm. Het verlies aan riboflavinemonofosfaat gedurende de autoclaafontsluiting bedraagt gemiddeld ca 15%, de overige vitameren zijn stabiel. De daarop volgende enzymatische hydrolyse geeft geen extra verliezen. De optimale hoeveelheid enzym en de optimale temperatuur voor de defosforylisering is vastgesteld.

De variatiecoëfficiënt (CV) van de analysemethode bedraagt voor vitamine B<sub>1</sub> 2,4% en voor vitamine B<sub>2</sub> 2,7%.

Het terugvindingspercentage van de additie van standaarden in vrije vorm en van de esters aan een twintigtal verschillende monstermaterialen bedraagt gemiddeld voor thiaminechloride 101%, voor thiaminemonofosfaat 99%, voor riboflavine 106% en voor riboflavinemonofosfaat 86%. Verder blijken de standaardoplossingen mits gekoeld bewaard gedurende minimaal 6 maanden stabiel te zijn. Spectrofotometrische vaststelling van het gehalte van de standaarden en controle van de standaardoplossingen is goed mogelijk, de procedures hiervoor zijn verder uitgewerkt.

De analysemethode is vastgelegd in een intern analysevoorschrift.

( )

( )

## 1 INLEIDING

In het kader van diverse projecten (o.a. NeVo) werkt het RIKILT mee aan het opbouwen van een adequaat nutriëntenbestand, waarbij voor het RIKILT de nadruk ligt op de analytische aspecten. Aangezien de te analyseren produkten zeer divers zijn, bijv. complete maaltijden, total diets, macrobiotische voedingsmiddelen, worden hoge eisen gesteld aan de selectiviteit en soms aan de detectiegrenzen van de methodes. In dit rapport wordt de ontwikkeling van een selectieve en gevoelige methode voor de simultane bepaling vitamine B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> in levensmiddelen beschreven.

Zoals uit voorgaand literatuuronderzoek (lit. 1) blijkt, vertonen de extractieprocedures van beide vitamines grote overeenkomst. Bovendien blijkt uit deze literatuurstudie dat de condities voor de hogedruk vloeistofchromatografie bijna gelijk zijn. De keuze om beide vitamines in één run te analyseren ligt dan ook voor de hand. De methode is gebaseerd op een ionpaar-chromatografische scheiding waarbij riboflavine rechtstreeks gedetecteerd wordt aan de hand van de eigen fluorescentie en waarbij thiamine vervolgens ook fluorimetrisch gedetecteerd wordt na post-column derivatisering tot thiochroom. Voor wat betreft de chromatografische condities en met name de eluenssamenstelling is het op grond van de te verwachten grote variatie in de matrixsamenstelling wenselijk, te weten welke parameters van het eluens de retentie van de vitamines het meest beïnvloeden. Te denken valt hierbij aan de concentratie van de ionpaarvormer en de methanolconcentratie. In hoofdstuk 2 zal hier nader op ingegaan worden.

Zowel vitamine B<sub>1</sub> als vitamine B<sub>2</sub> komen in de natuur voor in vrije vorm en als fosforzure esters, al dan niet gebonden aan eiwitten (lit. 1). De meest gebruikte extractiemethode bestaat uit een zure hydrolyse in een autoclaaf of in een kokend waterbad. Voor de bepaling van het totale vitaminegehalte vindt vervolgens een enzymatische hydrolyse met fosfatase plaats om de fosforzure esters volledig om te zetten in de vrije vormen. Hiertoe worden verschillende typen enzymen gebruikt en vaak mengsels van enzymen die naast fosfatase ook nog protease, mylase of diastase werking vertonen. In hoofdstuk 3 zal nader ingegaan worden op de extractieprocedures.



De toets van de analysemethode vindt plaats in hoofdstuk 4 waar de analyseresultaten voor wat betreft chromatografie, recovery en activiteit van de gebruikte enzymoplossing aan de orde komen.

In hoofdstuk 5 zal nader ingegaan worden op de controle van de zuiverheid van de gebruikte standaarden en de houdbaarheid van de daaruit gemaakte stock- en werkoplossingen.

Conclusies en aanbevelingen staan in hoofdstuk 6.

## 2 CHROMATOGRAFIE

In dit hoofdstuk zal nader ingegaan worden op de chromatografische condities voor de bepaling van vitamine B<sub>1</sub> en vitamine B<sub>2</sub>.

Uitgangspunten hierbij zijn:

- 1) de van nature voorkomende esters van beide vitamines worden bij de extractie en hydrolyse volledig omgezet in de vrije vormen, zodat scheiding van deze esters en vrije vorm niet noodzakelijk is
- 2) vitamine B<sub>1</sub> wordt na scheiding gederivatiseerd tot thiochroom, zodat fluorescentiedetectie mogelijk is in plaats van UV-detectie
- 3) vitamine B<sub>2</sub> wordt aan de hand van de eigen fluorescentie gedetecteerd.

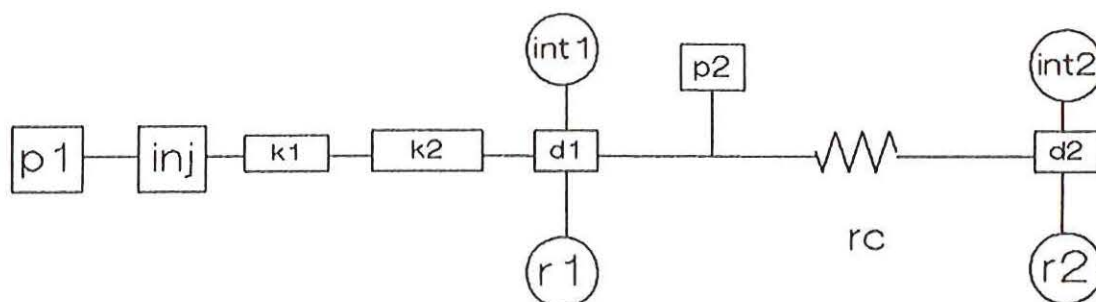
De voordelen hiervan zijn dat beide vitamines selectiever in complexe matrices bepaald kunnen worden.

De eerste ervaringen waren niet bevredigend, steeds last van lekkages bij de post-column derivatisering, instabiliteit van het chromatografisch systeem en slecht dupliceerbare resultaten. In paragraaf 2.1 zal hier nader op ingegaan worden.

De flexibiliteit van de methode wordt nader bekeken in paragraaf 2.2, waar nader ingegaan wordt op enkele parameters die de retentie van beide vitamines beïnvloeden.

### 2.1 Uitgangspunten

Uitgangspunt wat betreft de opstelling is in het schema weergegeven.



Hierin is:

- P<sub>1</sub> HPLC-pomp, Waters type 590, flow 1,0 ml/min
- Inj Injectieautomaat, Perkin Elmer type ISS-100, loop 200 µl, injectievolume 30 µl
- K<sub>1</sub> Voorkolom, Waters no. 84550, 20x4,0 mm, gevuld met Perisorb RP-18, Merck no.10437, deeltjesgrootte 30-40 µm
- K<sub>2</sub> Analytische kolom, Hypersil-5-ODS, 250x4,6 mm, deeltjesgrootte 5 µm, Chrompack no.28820
- D<sub>1</sub> Fluorescentiedetector t.b.v. riboflavine, Perkin Elmer type LS-4, excitatiegolflengte 468 nm, emissiegolflengte 520 nm, spectrale bandbreedte excitatie 15 nm, spectrale bandbreedte emissie 20 nm, meetcel 3 µl
- R<sub>1</sub> Recorder t.b.v. riboflavine, Kipp en Zonen type BD-40, meetbereik 10 mV, papiersnelheid 0,2 cm/min
- I<sub>1</sub> Integrator t.b.v. riboflavine, Apple IIe computer voorzien van Chromatochart en Chromadapt
- P<sub>2</sub> Reagenspomp, flow 0,1 ml/min, zie paragraaf 2.1.1
- RC Reactiespiraal, Teflon, lengte 150 cm, inwendige diameter 0,5 mm, inwendige diameter spiraal zie paragraaf 2.1.1
- D<sub>2</sub> Fluorescentiedetector t.b.v. thiochroom, Hitachi type F-1000, meetcel 12 µl, excitatiegolflengte 368 nm, emissiegolflengte 420 nm, inlet- en outlet-leiding van Teflon
- R<sub>2</sub> Recorder t.b.v. thiochroom, Kipp en Zonen type BD-40, meetbereik 10 mV, papiersnelheid 0,2 cm/min
- I<sub>2</sub> Integrator t.b.v. thiochroom, Spectra Physics type Minigrator

- eluens: los 0,063 M kaliumdiwaterstoffosfaat, 0,005 M heptaan-sulfonzuur-natriumzout, 0,0075 M tetra-ethylammoniumchloride op in ca. 400 ml water, breng op pH 3,5 met fosforzuur, voeg toe 350 ml methanol (Lichrosolv) en vul aan met water tot 1000 ml. Filtreer over 0,45  $\mu$ m.
- derivatiseringsreagens: los 0,14 g kaliumhexacyanoferraat op in ca. 100 ml water, voeg 66 ml kaliumhydroxide 50% (m/v) toe en vul aan met water tot 200 ml.
- standaardoplossingen: verdun van de werkoplossingen (zie 4.2) van de standaarden 1,0 ml met 50 ml 0,1 M zwavelzuur, breng op pH 4,0 met 2,5 M natriumacetaat, voeg 5,0 ml bufferoplossing toe en vul aan met water tot 100,0 ml (concentratie 0,1  $\mu$ g/ml).
- acetaatbuffer pH 4,0: breng 250 ml 1 M zwavelzuur met 2,5 M natriumacetaat op pH 4,0 en vul aan met water tot 500 ml.

#### 2.1.1 Post-column-reactor

Problemen die in de beginperiode optraden met betrekking tot de post-column-reactor (PCR) kunnen samengevat worden in 2 hoofdpunten nl. veel last van storingen (lekkages/verstoppingen) en twijfels aan de stabiliteit van de reagensflow. Oorzaak hiervan is het reagens dat visceus en zeer agressief is. Dit stelt dus hoge eisen aan de PCR en de reagenspomp.

In de opstelling uit die periode werd gebruik gemaakt van een slan-genpomp (Cenco no.34510) met een uitwendige diameter van de pompslang die afwijkt van de standaard 1/16" HPLC-leidingen. Bovendien werd een pulsdemper, een siliconenleiding van ca. 1 meter, gebruikt tussen reagenspomp en T-stuk naar analogie van Wielders et al. (lit. 2). Hierdoor zijn dus 2 koppelingen tussen reagenspomp en T-stuk noodza-kelijk. Gezien de agressiviteit van dit reagens moet gebruik van roestvast stalen materialen vermeden worden. Geschikte kunststof kop-pelingen van voldoende inert materiaal (Kel-F e.d.) waren toen echter niet voorhanden. De zelfgemaakte koppelingen bleken echter in de prak-tijk geen lange levensduur te hebben en vervanging cq verandering was erg arbeidsintensief.



Het gehele PCR-systeem was echter zeer gevoelig voor tegendruk. Dit kan veroorzaakt worden door de diameter en de lengte van de leiding, de diameter van de reactiespiraal zelf, en in het ergste geval door verstopping van de leiding door kristalvorming. De inwendige diameter van de kunststof leiding (0,5 mm) werd i.v.m. kans op piekverbreding niet veranderd. Ook de lengte (150 cm) werd niet veranderd omdat de verblijftijd, dus de reactietijd, in de spiraal al kort (slechts 17 seconden) is. Daarom werd wel de inlet-leiding van de detector (Hitachi, type F-1000) veranderd van 0,25 mm naar 0,33 mm en zelfs naar 0,50 mm inwendig, en de outlet-leiding van de detector van 0,33 naar 0,50 mm inwendig. Ook werd de outlet-leiding ingekort tot ca 30 cm. Om de kans op kristalvorming uit te sluiten werd nagegaan of in het reagens natriumhydroxide bruikbaar was in plaats van kaliumhydroxide. Achterliggende gedachte hierbij was dat kaliumcarbonaat de boosdoener was omdat de maximale zuiverheid van kaliumhydroxide slechts 85% bedraagt. Bereiding en gebruik van natriumhydroxide onder uitsluiting van  $\text{CO}_2$ , gaf geen oplossing van de problemen. Achteraf gezien, moet gebruik van natriumhydroxide zelfs afgeraden worden omdat in het afvalvat zeer sterke kristalvorming optreedt, waarschijnlijk door slechtere oplosbaarheid van natrium-zouten in methanol-water mengsels dan kalium-zouten. Verder kan aantasting van het roestvast stalen T-stuk reden zijn voor het voorkomen van kleine vaste deeltjes die de verstopping veroorzaken. Het alternatief, een Kel-F T-stuk, was pas in een later stadium commercieel verkrijgbaar.

Dat roestvast stalen leidingen aangetast worden door dit reagens, bleek overduidelijk toen geprobeerd werd het probleem met de koppelingen te omzeilen door HPLC-pompen te gebruiken in plaats van een slangenpomp. Voorafgaande aan deze experimenten werd eerst een drukbeveiliging (100 psi) voor de meetcel van de detector voor riboflavine ingebouwd (vóór het T-stuk en ná de eerste detector). Bij een flow van 0,1 ml/min bleek het reagens volledig ontkleurd te zijn door contact met pompkop, leidingen en pulsdemper van roestvast staal. Gebruik van deze pompen zonder pulsdemper is niet zinvol. Het reagens wordt overigens niet ontkleurd, wanneer de pulsdemper niet gebruikt wordt.

Bio-compatible uitvoeringen van deze pompen zijn vanwege de prijs weinig aantrekkelijk.

De oplossing van alle problemen leek gevonden te zijn door gebruik te maken van een ISCO-pomp (type WIZZ-RP). Dit is een zelfaanzuigende rotor pomp, waarbij alle in contact met vloeistof staande delen van kunststof zijn en waarbij 1/16" leiding gebruikt kan worden. Nadeel van deze pomp is echter de geringe druk die geleverd kan worden (max. 100 psi), zodat alle aanpassingen aan de geometrie van de PCR gehandhaafd moeten blijven om de tegendruk zo laag mogelijk te houden.

Na langdurig gebruik (ca. 1,5 jaar) bleek echter dat de pompkop en de rotor aan (dure) vervanging toe waren vanwege slijtage door gebruik van dit reagens.

Gelukkig waren in de tussentijd kunststof koppelingen verkrijgbaar die geschikt zijn voor de verbinding van de pompslang van een slangenpomp en HPLC-leiding. De extra pulsdemper werd overigens niet meer gebruikt. Ook een kunststof T-stuk was commercieel verkrijgbaar.

Zodoende werd uiteindelijk toch een pulsvrij en stabiel post-column-reactie systeem verkregen.

#### 2.1.2 Volume injectievloeistof in de vials

De in de voorgaande paragraaf omschreven aanpassingen van het PCR-systeem werden getest op stabiliteit gedurende een lange run (overnacht). Hiertoe werden uit een en dezelfde standaardoplossing van riboflavine en thiamine samen, elk 0,05 µg/ml, 8 vials van de injectieautomaat gevuld en uit elke vial werd 10-maal 20 µl geïnjecteerd. Uit de resultaten van thiamine (tabel 1) blijkt (F-toets:  $F=47,5$   $p=0,05$  ;  $F_{7,72}=2,1$ ) dat er significante verschillen bestaan in dupliceerbaarheid tussen vials onderling ( $s^2=144 \times 10^6$ ), terwijl injectie in tienvoud uit dezelfde vial steeds goede dupliceerbare verschillen ( $s^2=3,45 \times 10^6$ ) opleverde. De resultaten van riboflavine leveren echter geen significante verschillen op in dupliceerbaarheid tussen en binnen vials. Ook de retentietijden van zowel riboflavine als van thiamine zijn constant. Hieruit blijkt duidelijk dat de oorzaak van die verschillen niet bij de injectieautomaat gezocht moeten worden.

Tabel 1: De gemiddelde retentietijd in secondes, het gemiddelde oppervlak en de bijbehorende standaardafwijking in oppervlakte-eenheden en de variatiecoëfficiënt in procenten van een en dezelfde standaard oplossing thiamine (concentratie 0,5 µg/ml) 10 x geïnjecteerd uit 8 verschillende vials. Chromatografische condities zijn in 2.1 beschreven.

vial nr.	retentietijd	oppervlakte		
	gemiddeld	gemiddeld	st. afwijking	VC
1	323,8	71625	1648	2,30
2	322,5	69370	1405	2,02
3	323,6	69092	996	1,44
4	325,2	63633	2077	3,26
5	325,9	67613	2196	3,25
6	326,7	60212	3043	5,05
7	327,8	63415	1256	1,98
8	328,1	61403	1381	2,25

Bij nader bekijken van het restant oplossing in de vials leek het erop dat de vial met het kleinste restvolume ook de laagste piekoppervlakte opleverde.

Om dit te toetsen werd bij een volgend experiment uit een en dezelfde standaardoplossing van Rb en Th samen, 5 vials gevuld met 0,5 ml, 5 vials met 1,0 ml en 5 vials met 2,0 ml (=vol) standaardoplossing en vervolgens geïnjecteerd. De retentietijden van riboflavine en thiamine waren wederom constant. Bij riboflavine waren geen verschillen te zien in piekhoogte tussen de drie verschillende volumina in de vials. Bij thiamine was een duidelijk verschil tussen de piekhoogte bij 0,5 ml en die bij 1,0 ml (8,4%). Tussen de piekhoogte bij een volume van 1,0 ml van de monstervloeistof in de vial en die bij 2,0 ml was er slechts een verschil van 3,1%. Tweemaal herhalen van dit experiment leverde dezelfde resultaten, zie tabel 2. Omdat er geen duidelijke verklaring te vinden was voor dit toch wel bijzondere verschijnsel, werd besloten om steeds de vials te vullen met een zelfde hoeveelheid (1,0 ml) monstervloeistof. Zodoende werd deze extra bijdrage aan duploverschillen voor de bepaling van thiamine uitgesloten.



Tabel 2: De gemiddelde piekhoogte in cm voor een standaardoplossing thiamine (concentratie 0,5 µg/ml), de daaruit berekende standaardafwijking  $s$  en variatiecoëfficiënt VC van injecties, in vijfvoud uit vials met verschillende volumina monsteroplossing in ml bij 3 opeenvolgende experimenten. Chromatografische condities zijn in 2.1 beschreven.

experiment	volume	gemiddelde	$s$	VC
1	0,5	11,15	0,094	0,84
	1,0	12,08	0,120	1,00
	2,0	12,72	0,202	1,59
2	0,5	11,34	0,065	0,57
	1,0	12,40	0,050	0,40
	2,0	12,54	0,108	0,86
3	0,5	10,96	0,065	0,59
	1,0	11,78	0,076	0,64
	2,0	12,11	0,129	1,07

Uit deze experimenten aangaande de hoeveelheid injectievloeistof in de vials bleek overigens ook dat het PCR-systeem zeer stabiel en betrouwbaar was en dat menging van de reagensflow met de eluensflow voldoende was.

### 2.1.3 Stabilisering chromatografisch systeem

In het begin van een analyserun bleek de piekoppervlakte van riboflavine toe te nemen bij injectie van eenzelfde standaard, terwijl die van thiamine constant bleef. Een verklaring zou kunnen zijn dat er geringe adsorptie plaatsvindt van riboflavine aan de kolom. Deze problemen werden voorkomen door vóór aanvang van een analyserun:

- het chromatografisch systeem te equilibreren gedurende 16 uur (overnacht) met een flow van 0,2 ml/min of gedurende minimaal 2 uur met een flow van 1,0 ml/min,
- minimaal 3 standaarden (concentratie 0,1 µg/ml) te injecteren en aan het begin en eind van een analyserun een reeks standaardoplossingen te injecteren.

## 2.2 Flexibiliteit chromatografisch systeem

Gezien het grote verschil in matrix van de te analyseren monsters (zie Inleiding) is het zinvol om inzicht te hebben in de chromatografische condities die de retentie bepalen van beide vitamines. Eventueel voorkomende storende componenten kunnen gemakkelijker onderkend worden en door gebruik te maken van dit inzicht misschien zelfs volledig gescheiden worden.

De voornaamste parameters in het eluens die daarvoor in aanmerking komen zijn de methanolconcentratie en de tegenion-concentratie. In de volgende paragrafen zal hier nader op ingegaan worden. Methanol werd als organische modifier gekozen omdat hierbij de omzetting van thiamine in thiochroom beter verloopt. Omdat de zoutconcentratie in het eluens niet te hoog mag worden vanwege de post-column reactie, werd deze niet gevarieerd.

### 2.2.1 Methanolconcentratie in het eluens

Om na te gaan wat de invloed is van de methanolconcentratie in het eluens op de retentie van de componenten Rb en Th werd deze gevarieerd, terwijl de overige parameters gelijk bleven (zie 2.1). De tegenion-concentratie is 0,0075 M. Geïnjecteerd werden daartoe standaardoplossingen (0,1 µg/ml) in buffer pH=4,0. Ook werden de monofosfaatesters van beide vitamines (FMN resp. TMP) geïnjecteerd (concentratie eveneens 0,1 µg/ml in buffer pH=4,0).

Uit de resultaten van tabel 3 en grafiek 1 (bijlage A) blijkt duidelijk dat de methanolconcentratie slechts binnen bepaalde grenzen gevarieerd kan worden onder deze condities. Een concentratie van  $\pm 20\%$  en lager, geeft niet alleen een extreem lange retentietijd voor Rb,

maar zorgt er ook voor dat Th opgesplitst wordt in twee pieken ( $t_r$  ca 860 s en  $t_r$  ca 900 s). Wanneer de methanolconcentratie hoger wordt dan 35% is de retentie niet meer voldoende ( $k' < 2$ ). De retentie van de esters blijft zoals te verwachten was, zelfs bij lage methanolconcentratie slecht (TMP  $k' < 1$ ; FMN  $k' \approx 2$ ).

Tabel 3: Invloed van de methanolconcentratie (%) in het eluens op de retentietijden (s) van de componenten TMP, Th, FMN en Rb bij een tegenion-concentratie van 0,0075 M. (Voor de overige condities zie 2.1).

methanol- concentratie	retentietijd			
	TMP	Th	FMN	Rb
20	280	862/896	474	<u>+1600</u>
25	254	581	338	870
30	232	412	260	460
35	236	345	236	402

#### 2.2.2 Tegenion-concentratie eluens

Om de invloed van de tegenion-concentratie (heptaansulfonzuur natriumzout) in het eluens op de retentie van de beide vitamines en hun resp. monofosfaatesters na te gaan werd deze gevarieerd, terwijl de overige parameters constant werden gehouden (methanolconcentratie 25%, overige condities zie 2.1).

Tabel 4: Invloed van de tegenion-concentratie (M) in het eluens op de retentietijden (s) van de componenten TMP, Th, FMN en Rb bij een methanolconcentratie van 25%. (Voor de overige condities zie 2.1).

tegenion- concentratie	retentietijd			
	TMP	Th	FMN	Rb
0,0050	254	581	338	870
0,0075	265	700	289	766
0,0100	284	893	275	756



Uit de resultaten van tabel 4 en grafiek 2 (bijlage A) blijkt dat de retentie van thiamine duidelijk vergroot wordt door toename van de concentratie van het tegenion in het eluens. De retentie van riboflavine wordt enigszins verminderd bij toenemende concentratie tegenion. De esters gedragen zich hetzelfde als de bijbehorende vrije vormen, zij het minder sterk ( $k' < 1$ ).

### 3 EXTRACTIE

In de literatuur wordt voor de extractie van de beide vitamines meestal uitgegaan van de AOAC-procedure (lit. 3). Hierbij wordt het monstermateriaal gedurende 30' bij 121°C in een autoclaaf ontsloten om alle matrixbindingen te verbreken. Vervolgens worden met behulp van het enzymmengsel Claradiastase, dat ook fosfatase bevat, de fosforzure esters van beide vitamines omgezet in de vrije vormen. Helaas verwijderde de leverancier dit enzym uit zijn leveringspakket, zodat naar een andere oplossing gezocht moest worden.

Een mogelijkheid zou zijn om de esters en de vrije vormen van beide vitamines apart te bepalen en vervolgens te sommeren. Dit is echter niet mogelijk met ons chromatografisch systeem door de grote onderlinge verschillen in polariteit (zie ook paragraaf 2.2).

Een goed alternatief voor Claradiastase is het enzymmengsel Mylase, ware het niet dat ook dit enzym, na ca 1 jaar gebruik, door de fabrikant niet meer geleverd werd.

Het enzymmengsel Takadiastase bleek bij oriënterende experimenten een redelijk alternatief te bieden, ofschoon de hydrolysetijd nodig voor volledige omzetting aanzienlijk langer is. De experimenten voor de vaststelling van de optimale condities worden in paragraaf 3.1 nader omschreven voor standaarden.

Aan de AOAC-procedure voor de ontsluiting met zoutzuur kleeft een nadeel nl. de autoclaaf wordt op den duur aangetast door zoutzuur.

Om dit te vermijden werd gekozen voor de ontsluiting met zwavelzuur (lit. 4) in de autoclaaf. Op de stabiliteit van de standaarden gedurende deze autoclaafontsluiting wordt in paragraaf 3.2 nader ingegaan.

### 3.1 Enzymatische hydrolyse

Uitgangspunt was de enzymatische hydrolyse overnacht uit te voeren aangezien dit het beste past in het totale analyseschema. Derhalve werd de hydrolysetijd niet gevarieerd. Nagegaan werd of de vrije vorm stabiel is gedurende deze tijd bij verhoogde temperatuur en bij een voor riboflavine ongunstige pH. Volgens opgave van de leverancier is voor dit enzymmengsel de optimale pH 4,0. Dit werd verder niet gecontroleerd. De optimale temperatuur voor Takadiastase is 45°C, terwijl volgens de literatuur de optimale temperatuur voor fosfatase 37°C bedraagt. De invloed van beide temperaturen op de omzetting van de esters werd nagegaan. Ook de hoeveelheid enzym die toegevoegd moet worden om een maximale omzetting te verkrijgen werd vastgesteld. Daartoe werd 1,0 resp. 0,5 ml werkoplossing van FMN resp. TMP (concentratie 10,0 µg/ml) verdund met 0,1 M zwavelzuur tot 50 ml en op pH 4,0 gebracht met 2,5 M natriumacetaat. Vervolgens werd de gewenste hoeveelheid enzym Takadiastase (Serva no. 35740) opgelost in water toegevoegd, gedurende ca. 16 uur (overnacht) bij 37°C of 45°C in een stoof geïncubeerd, na afkoelen aangevuld tot 100 ml en hieruit 20 µl geïnjecteerd. De gevonden concentraties na volledige omzetting kunnen theoretisch 0,07317 µg/ml voor Rb en 0,0361 µg/ml voor Th bedragen. Bij de berekening van de omzetting werd rekening gehouden met het theoretisch gehalte aan vrije vorm in de ester (voor FMN 73,2%, voor TMP 72,2%, zie ook 5.1.2 en 5.1.4). Dit betekent dus dat de omzetting van ester in vrije vorm voor beide vitamines bekeken wordt op 75% van het hoogste ijkpunt. De recovery van de vrije vormen en de omzettingsspercentages van de esters werden verder berekend t.o.v. een externe standaard, na correctie voor de blanco-waarde van het enzym.

Uit de resultaten, gemiddelde van duplo's, van tabel 5 blijkt duidelijk dat de optimale condities voor de enzymatische hydrolyse (maximale omzetting van de esters) toevoeging van 1,0 g enzym en een temperatuur van 45°C zijn. De omzetting is volledig (>98%), zelfs indien beide esters in dezelfde oplossing aanwezig zijn (concentratie van TMP 0,05 µg/ml, van FMN 1,0 µg/ml; dit zijn de tussen haakjes geplaatste cijfers in tabel 5). De vrije vormen Rb en Th zijn onder deze condities stabiel.



Tabel 5: De recovery van de vrije vormen Rb en Th en de omzettingspercentages van de esters FMN en TMP bij 37°C en 45°C als functie van de hoeveelheid toegevoegd Takadiastase in grammen gedurende de enzymatische hydrolyse gedurende een nacht. Chromatografische condities zijn in 2.1 beschreven.

component	hoeveelheid enzym	37°C	45°C
Rb	0,0	101,7	97,5
Rb	0,5	102,9	106,0
Rb	1,0	101,2	105,2
Th	0,0	100,7	100,8
Th	0,5	100,9	101,2
Th	1,0	100,2	99,5
FMN-->Rb	0,5	91,6	96,4 (96,1)
FMN-->Rb	1,0	95,7	99,4 (98,5)
TMP-->Th	0,5	82,4	96,4 (93,2)
TMP-->Th	1,0	93,1	102,4 (99,6)

Opmerkelijk bij dit experiment was verder dat de blancowaarde van dit enzym van batch tot batch verschillend is. Het gehalte aan Rb in dit enzym bedraagt globaal 0,8-1,2 µg/g en 0,4-0,8 µg/g aan Th. Door het aanwezig zijn van een blancowaarde dient aandacht besteed te worden aan een goede procedure voor de exacte vaststelling ervan. Derhalve werd ervoor gekozen het enzym als oplossing met behulp van een mechanische pipet toe te voegen in plaats van als vaste stof. Daarnaast werd aan ieder ijkpunt van de ijklijn eenzelfde hoeveelheid enzymoplossing toegevoegd. De resulterende ij-asafsnijding geeft een goede schatting van de blancowaarde van het enzym.

### 3.2 Autoclaafontsluiting

Zoals eerder al vermeld, wordt voor de autoclaafontsluiting gekozen. De temperatuur bedraagt  $121^{\circ}\text{C}$ , de tijd is 30 minuten en als zuur wordt zwavelzuur gebruikt. De stabiliteit onder deze omstandigheden werd vastgesteld voor elk vitamine, zowel voor de vrije vorm als voor de fosfaatester (concentratie van TMP en Th  $0,05\text{ }\mu\text{g/ml}$ , van FMN en Rb  $0,10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ).

Uit dit experiment blijkt het terugvindingspercentage, gemiddeld over 3 waarnemingen, voor Rb, FMN, Th, en TMP resp. 95, 81, 94 en 93% te bedragen ten opzichte van een standaard die niet de autoclaafprocedure heeft doorlopen. Als gevolg daarvan werd besloten om steeds de berekeningen uit te voeren met een standaard die de hele procedure doorlopen heeft. Omdat FMN minder stabiel is in de autoclaaf dan Rb kan dus voor FMN slechts een omzettingspercentage bereikt worden van maximaal 85%. Bij het terugvindingspercentage van FMN dient opgemerkt te worden dat FMN door autoclaveren reeds voor 7% wordt omgezet in Rb, zie chromatogrammen in bijlage B.

Verder bleek uit experimenten aangaande de autoclaafontsluiting dat het plekoppervlak van beide vitamines afhankelijk is van de zoutconcentratie in het extract. Omdat bij monstermateriaal de pH produkt-afhankelijk is, is de hoeveelheid natriumacetaat nodig om de extracten op pH 4,0 te brengen voor de enzymatische hydrolyse niet constant en dus ook de zoutconcentratie niet. Om dit probleem het hoofd te bieden werd aan elk extract, dus ook aan de standaarden, 5,0 ml natriumacetaatbuffer pH 4,0 toegevoegd. Zodoende is de zoutconcentratie in de injectievloeistof niet meer afhankelijk van het type produkt.

### 4 TOEPASSING ANALYSEMETHODE

De in voorgaande hoofdstukken beschreven methode werd toegepast op een vijftigtal verschillende voedingsmiddelen, die in het kader van een onderzoeksproject t.b.v. de Stichting Nederlands Voedingsstoffenbestand in de periode maart-augustus 1989 ter onderzoek werden aangeboden. De methode voor de simultane bepaling van vitamine  $B_1$  en vitamine  $B_2$  is vastgelegd in bijlage C. Omdat van de meeste monsters geen gehalte bekend was, werd eerst een globaal gehalte vastgesteld.

Vervolgens werd de inweeg uit de slurry dusdanig gekozen dat de concentratie van de meetoplossing midden in het ijklijn gebied ligt. Dit geldt zowel voor thiamine als voor riboflavine. De inweeg uit de slurry mag echter niet groter zijn dan overeenkomt met 5 gram niet-vermalen monster, omdat bij grotere inweeg de hoeveelheid fosfatase in de enzymoplossing te laag is voor een goede omzetting van de esters TMP en FMN.

De chromatografische scheiding is voor wat betreft de bepaling van riboflavine voldoende. Geen van de monsters bleek storende componenten op te leveren in het chromatogram. Bij de bepaling van thiamine bleek echter dat een drietal produkten (zuurkool, grapefruitsap en rode kool) wel storende componenten opleverde, waardoor de piek van thiochroom een schouder vertoont. In bijlage D zijn de chromatogrammen van deze produkten opgenomen, evenals een aantal normale chromatogrammen van riboflavine en thiochroom.

Ter vaststelling van het terugvindingspercentage werden aan twintig voedingsmiddelen vóór de extractie standaarden toegevoegd. De additie vindt dusdanig plaats dat globaal de concentratie in de meetoplossing verdubbeld wordt en deze binnen het ijklijngebied van beide vitamines blijft. Daartoe werd aan een bekende hoeveelheid slurry 500 µl van de werkoplossing riboflavine resp. 250 µl werkoplossing thiamine toegevoegd en verder volgens voorschrift behandeld. Aan een afzonderlijke bekende hoeveelheid slurry werd 1000 µl van de werkoplossing riboflavinemonofosfaat resp. 500 µl van de werkoplossing thiaminemonofosfaat toegevoegd. Hieruit werden de terugvindingspercentages berekend als gemiddelden van duplobepalingen.

Uit de resultaten van tabel 6 blijkt dit voor Rb te liggen tussen 99 en 116 met een gemiddelde van 106%, voor FMN tussen 78 en 98 met een gemiddelde van 86%, voor Th tussen 88 en 121 met een gemiddelde van 101% en voor TMP tussen 92 en 114 met een gemiddelde van 99%. Dat het gemiddelde terugvindingspercentage voor Rb groter is dan 100% wijst waarschijnlijk op verschillen in stabiliteit van Rb gedurende het autoclaveren onder invloed van matrix. In paragraaf 3.2 is aangetoond dat er tengevolge van autoclaveren een verlies aan riboflavine



optreedt van 95% vergeleken met een externe standaard die niet de procedure met autoclaveren doorlopen heeft. De resultaten die nu gevonden worden wijzen erop dat door een of meerdere componenten uit de matrix riboflavine tegen afbraak beschermd wordt.

Tabel 6: Het gemiddelde terugvindingspercentage van duplo addities van Rb, FMN, Th en TMP aan de verschillende produkten en de omzettingspercentages van de standaardoplossingen FMN en TMP ter controle van de bij deze serie gebruikte enzymoplossing.

produkt	terugvindingspercentage				omzettingspercentage	
	Rb	FMN	Th	TMP	FMN	TMP
rijst	103	82	101	102	82	98
tarvobrood	106	88	99	100	81	98
rundergehaakt	110	86	106	94	85	96
ribkarbonade	104	88	102	94	84	100
varkenslap		88		101	84	92
schouderham	99	85	98	106	84	100
ontbijtspek	114	92	91	92	79	102
kipfilet	103	84	104	98	83	97
haring	104	84	100	102	78	91
schol	114	87	100	100	81	98
andijvie	102	88	92	92	82	98
paprika		82		102	82	102
tomaten	106	83	108	99	82	104
bruine bonen	101	78	101	102	82	104
mayonaise	109	84	121	114	83	108
chocoladehagel	116	98	88	93	84	92
honing	104	80	97	98	83	100
bier	108	93	101	100	77	110
-----						
gemiddeld	106	86	101	99	82	99
stand. afw.	5,0	4,8	7,6	5,4	2,2	5,2

Het terugvindingspercentage van toegevoegd FMN lijkt aan de lage kant. Uit de resultaten van paragraaf 3.2 blijkt echter dat FMN minder stabiel is in de autoclaaf dan Rb en dat er daardoor slechts een maximale recovery haalbaar is van 85%, zodat de resultaten van de terugvindingspercentages voor FMN goed te noemen zijn.

De activiteit van het gebruikte enzym werd per analyseserie gecontroleerd. Daartoe werd 1000 µl werkstandaard FMN en 500 µl werkoplossing TMP gepipeteerd in een erlenmeyer van 100 ml en verder volgens voorschrift behandeld (dus inclusief autoclaveren en met dezelfde hoeveelheid enzymoplossing als de monsters).

De omzettingspercentages van de standaard FMN ligt tussen 77 en 85 met een gemiddelde van 82% en die van TMP tussen 91 en 110 met een gemiddelde van 99%, zie eveneens tabel 6. De variatie in de activiteit van de gebruikte enzymoplossing is gering.

Ook voor de standaard FMN is het omzettingspercentage/terugvindingspercentage groter wanneer matrix aanwezig is, nl. zonder matrix gemiddeld 82% vs met matrix gemiddeld 86%. Dit zou evenals bij riboflavine op een of andere beschermende werking kunnen wijzen van componenten uit die matrix.

Tabel 7: Overzicht van de gemeten concentraties van duplowaarden in µg/ml, het daaruit berekende relatieve verschil (%) en de daaruit berekende relatieve herhaalbaarheid voor thiaminechloride en riboflavine voor de onderzochte produkten.

produkt	thiaminechloride			riboflavine		
	duplowaarden		%	duplowaarden		%
rijst	0.0061	0.0054		0.0190	0.0190	0.00
tarvobrood	0.0177	0.0175	1.14	0.0192	0.0189	1.57
rundergehakt	0.0102	0.0099	2.99	0.0334	0.0332	0.60
ribkarbonade	0.0556	0.0563	1.25	0.0093	0.0093	
varkenslap	0.0160	0.0157	1.89	0.0140	0.0130	7.41
schouderham	0.0403	0.0386	4.31	0.0213	0.0209	1.90
ontbijtspek	0.0380	0.0369	2.94	0.0184	0.0190	3.21
kipfilet				0.0515	0.0518	0.58
haring				0.0497	0.0512	2.97

Vervolg tabel 7.

produkt	thiaminechloride			riboflavine		
	duplowaarden		%	duplowaarden		%
schol	0.0216	0.0216	0.00	0.0511	0.0547	6.80
andijvie	0.0278	0.0275	1.08	0.0338	0.0332	1.79
paprika	0.0238	0.0230	3.42	0.0959	0.0966	0.73
tomaten	0.0184	0.0200	8.25	0.0084	0.0091	
bruine bonen	0.0253	0.0245	3.21	0.0171	0.0164	4.18
mayonaise	0.0050	0.0050		0.0169	0.0171	1.18
chocohagel	0.0047	0.0047		0.0322	0.0300	7.07
bier				0.0106	0.0110	3.70
CV herhaalbaarheid			2.4%	2.7%		
relatieve herhaalbaarheid			6.6%	7.5%		

De relatieve herhaalbaarheid voor thiaminechloride en riboflavine werd berekend uit de gevonden duplo-waarden van de meetoplossing van de in tabel 7 onderzochte produkten. De niet berekende relatieve verschillen wijzen op een meetwaarde kleiner dan de laagste standaard. Uit de resultaten blijkt dat de verschillen tussen 2 duplo's voor thiaminechloride en riboflavine maximaal 6,6% resp. 7,5% van het gemiddelde mogen bedragen. Bij een inweeg van 5 gram monster betekent dit bij een gevonden concentratie gelijk aan de laagste standaard (0,01 µg/ml) dat het daaruit berekende gehalte voor thiaminechloride 0,02 mg/100 gram bedraagt +/-3,3%.

Bij deze experimenten bleek verder dat de standaardlijnen van riboflavine aan het begin en aan het eind van een serie analysemonsters soms meer dan 5% verschilden ten opzichte van elkaar. Bij een serie met minder dan 20 analysemonsters was het verschil tussen beide standaardlijnen steeds kleiner dan 5%. Dit probleem kan dus voorkomen worden door bij series met meer dan 20 analysemonsters tussendoor ook een standaardlijn te injecteren en de concentraties van de meetoplossingen van de monsters te berekenen met de ijkfactor, vastgesteld aan de hand van de 2 dichtstbijliggende standaardlijnen. De oorzaak van dit verschijnsel dient nader onderzocht te worden. Te denken valt hierbij aan koeling van de meetoplossingen in de injectie-automaat.



## 5 STANDAARDEN

In dit hoofdstuk zal nader ingegaan worden op de zuiverheid van de gebruikte standaarden Rb, FMN, Th en TMP en de houdbaarheid van de stock- en werkoplossingen die hieruit bereid zijn. Bovendien zal de procedure voor de controle van het gehalte en de zuiverheid van de gebruikte werkoplossingen nader omschreven worden.

### 5.1 Zuiverheid

In de recente HPLC-literatuur worden geen procedures omschreven voor de controle van de zuiverheid van de standaarden. Er wordt steeds uitgegaan van het gegeven dat de standaard, die van te voren gedroogd is, zuiver is. De standaardoplossingen worden over het algemeen gekoeld bewaard in zuur milieu in het donker. Vooral Rb en FMN zijn lichtgevoelig, met name in alkalisch milieu. Alle werkzaamheden dienen dan ook zoveel mogelijk onder uitsluiting van daglicht te gebeuren; gebruik van bruin glaswerk wordt ten zeerste aanbevolen.

Tabel 8 geeft een overzicht van enkele fysische eigenschappen van de standaarden. In bijlage E en F zijn de UV-spectra weergegeven.

Tabel 8: Overzicht van de molecuulformules, de gebruikte afkortingen, de molecuulmassa's M, de golflengten van de maxima van het absorptiespectrum ( $\lambda_{\max}$ ) en de daarbij horende extinctiecoëfficiënten (E1%,1cm) voor de standaarden in zuur milieu.

component	molecuulformule	afkorting	M	$\lambda_{\max}$	E1%,1cm
Riboflavine	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	Rb	376.37	445	+320
				266	850
				222	?
Riboflavine-					
monofosfaat	$C_{17}H_{21}N_4O_9P$	FMN	456.4		
	$C_{17}H_{20}N_4O_9PNa \cdot 2H_2O$	FMNNa $\cdot 2H_2O$	514.37	445	+234
Thiamine	$C_{12}H_{17}ClN_4OS$	Th	300.8		

Vervolg tabel 8.

component	molecuulformule	afkorting	M	$\lambda_{\max}$	E1%, 1cm
Thiamine-					
hydrochloride	$C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$	Th.HCl	337.27	246	425
				236	324
				273	250
Thiamine-					
monofosfaat	$C_{12}H_{18}ClN_4O_4PS \cdot 2H_2O$	TMP	416.82	246	+ 344
				236	+ 262
				273	+ 202

Strohecker et al. (lit. 5) wijst er op dat het gehalte en de zuiverheid bepaald kan worden aan de hand van spectrofotometrische metingen.

#### 5.1.1 Zuiverheid riboflavine

In de literatuur bestaat geen overeenstemming over de te volgen procedure bij de bereiding van de stock-oplossing van riboflavine. Naast verschillende droogprocedures (stoof  $100^{\circ}C$ , boven fosforpentoxide of boven gec. zwavelzuur), worden ook verschillende procedures omschreven voor het oplossen van de vaste stof.

In het EG-voorschrift voor de bepaling van veevoeders (lit. 6) wordt de standaard eerst opgelost in een klein volume 5% (m/v) natriumhydroxide-oplossing, vervolgens zo snel mogelijk aangezuurd met een aliquot gec. azijnzuur en verder doorverdund met 0.1 M zwavelzuur (concentratie stock-oplossing: 100  $\mu g/ml$ ).

De AOAC-procedure gebruikt geen alkalische oplosstap maar lost de standaard rechtstreeks op in 0.02 M azijnzuur onder verwarmen tot max.  $60^{\circ}C$  (lit. 3). De concentratie van de stockoplossing bedraagt echter slechts 50  $\mu g/ml$  in verband met de slechtere oplosbaarheid van de standaard, ondanks verwarmen.

Bognar (lit. 4) lost de standaard rechtstreeks op in 0.1 M zwavelzuur onder verwarmen tot  $60^{\circ}C$ .



Naast bovengenoemde procedures worden nog een aantal verwante varianten genoemd. Essentieel is echter dat de standaard zo snel mogelijk in zuur milieu opgenomen wordt in verband met snelle afbraak in alkalisch milieu vooral onder invloed van daglicht. Spectrofotometrische controle van een stock-oplossing, verdund tot 10 µg/ml die volgens de EG procedure was aangemaakt en vervolgens gedurende minimaal 2 jaar in de koelkast was bewaard, leverde een spectrum op waarbij het maximum bij 222 nm een viermaal hogere extinctiewaarde heeft dan bij het maximum bij 266 nm, terwijl het spectrum van een op gelijke wijze vers bereide stockoplossing een verhouding van 0,9 oplevert voor het maximum bij 222 nm t.o.v. dat bij 266 nm (zie bijlage G).

Opmerkelijk hierbij was verder dat uit berekening aan de hand van de  $E_{1\%,1\text{cm}}$ -waarde bij 266 nm geen afname van het gehalte bleek gedurende deze 2 jaar. Dit zou kunnen wijzen op een sterk UV-absorberend afbraakprodukt dat ontstaat bij het oplossen en bij langere bewaring. Invloed van licht tijdens de alkalische oplosstap zou de vorming van dit afbraakprodukt kunnen bevorderen.

Opnieuw bereiding van een verse stock-oplossing volgens dezelfde procedure leverde een verhouding  $E_{222}/E_{266}$  van 1,04 op in plaats van de eerder gegeven verhouding van 0,9.

Bereiding van een stock-oplossing volgens Bognar, dus zonder de alkalische oplosstap, leverde wel een verhouding  $E_{222}/E_{266}$  van 0,90 op. Bewaring van de stock-oplossingen, bereid volgens beide procedures gedurende een jaar leverde geen toename op van de oorspronkelijk gevonden waarde voor de verhouding  $E_{222}/E_{266}$ . Toch verdient de oplosstap met natronloog geen aanbeveling in verband met de al eerder genoemde instabiliteit van riboflavine in dit milieu. De procedure van Bognar wordt dan ook in het vervolg gehanteerd.

Verder werd geconstateerd dat de globale  $E_{1\%,1\text{cm}}$ -waarde bij 445 nm, waarvoor ook Strohecker slechts een globale waarde (zie tabel 8) van  $+320$  aangeeft, naar alle waarschijnlijkheid te hoog is. Berekening van het gehalte aan de hand van de  $E_{1\%,1\text{cm}}$ -waarde van 850 bij 266nm van 3 stock-oplossingen leverde een gehalte op van  $>98\%$ . Berekening van het gehalte aan de hand van de  $E_{1\%,1\text{cm}}$ -waarde van 320 bij 445 nm van deze 3 stock-oplossingen leverde daaraantegen een gehalte op van  $+96\%$  (zie tabel 9). Een betere benadering van deze  $E_{1\%,1\text{cm}}$ -waarde zou 309 zijn.

Tabel 9: Resultaten van de extinctiemetingen bij de golflengten 266, 445 en 222 nm en de daaruit berekende gehalten van de standaard Rb (BDH no.44088). Metingen zijn uitgevoerd op Beckman DU-40 in 1 cm cuvet t.o.v. 0,1M zwavelzuur.

concentratie berekend uit inweeg	E266	gehalte berekend uit E266	E445	gehalte berekend uit E445	E222
10,0 µg/ml	0,844	99,3%	0,308	96,2%	0,760
10,0 µg/ml	0,838	98,6%	0,308	96,2%	0,761
10,0 µg/ml	0,834	98,1%	0,307	95,9%	0,742

De verliezen ten gevolge van drogen boven fosforpentoxide tot constant gewicht bij de bereiding van deze 3 stock-oplossingen waren overigens zeer gering (0,00-0,50%); 16 uren drogen bleek voldoende.

#### 5.1.2 Zuiverheid riboflavinemonofosfaat

Voor de controle van de zuiverheid van riboflavinemonofosfaat zijn in de literatuur eveneens geen procedures omschreven. Strohecker et al. (lit. 5) nemen aan dat de spectra van de ester en de vrije vorm niet van elkaar verschillen en dat de fosfaatgroep geen invloed heeft. De extinctie van de fosfaatester wordt waarschijnlijk bepaald door het gehalte riboflavine in deze ester. Theoretisch aan de hand van de molecuulmassa is dit gehalte 73,17%. Berekening van de E1%,1cm-waarden bij 266 en 445 nm levert theoretische waarden op van 622 resp. 226. Strohecker geeft voor de laatstgenoemde golflengte een globale waarde van 234. De waarde 226 is berekend uit de gecorrigeerde E1%,1cm, zie 5.1.1.

Om dit te controleren werden 2 oplossingen bereid van een standaard FMN.Na.2H<sub>2</sub>O na drogen tot constant gewicht boven fosforpentoxide (vochtverlies 3,1 resp. 5,4%) in 0,1 M zwavelzuur en spectrofotometrisch gemeten. Hieruit werd vervolgens het gehalte berekend aan de hand van de E1%,1cm-waarde.

Tabel 10: Resultaten van de extinctiemetingen bij de golflengten 266, 445 en 222 nm en de daaruit berekende gehalten van de standaard FMN.Na.H<sub>2</sub>O (Fluka no.83810). Metingen zijn uitgevoerd op Beckman DU-40 in 1 cm cuvet t.o.v. 0,1M zwavelzuur. Bij de berekening van het gehalte uit E445 is de E1%,1cm-waarde 226 gebruikt.

concentratie berekend uit inweeg	E266	gehalte berekend uit E266	E445	gehalte berekend uit E445	E222
10,0 µg/ml	0,621	99,8%	0,227	100,4%	0,560
10,0 µg/ml	0,614	98,7%	0,225	99,6%	0,552

In bijlage E zijn de spectra opgenomen van riboflavine resp. riboflavinemonofosfaat. De maxima blijken inderdaad niet te verschuiven en de onderlinge verhoudingen van de extincties zijn gelijk. Ook de resultaten van tabel 10 wijzen erop dat deze aanname waarschijnlijk terecht is. De berekende gehalten voldoen ook aan de specificaties van de leverancier (>98%).

Verder levert berekening van de E1%,1cm-waarde bij het derde maximum (222 nm) van riboflavine een gemiddelde waarde op van 754 (zie tabel 9). Omgerekend naar de ester wordt dit 552 voor dit maximum. Meting van de ester bij deze golflengte levert na omrekening een gehalte van 101,4 resp. 100,0%.

### 5.1.3 Zuiverheid thiaminechloridehydrochloride.

Strohecker et al. (lit. 5) beschrijft een spectrofotometrische methode voor de controle van de zuiverheid van thiaminechloridehydrochloride (Th.HCl). De E1%,1cm-waarden zijn echter sterk pH afhankelijk. In tabel 8 staat deze waarde vermeld in zuur milieu (pH 2,0) voor het maximum bij 246 nm. De overige 2 waarden zijn die van de isobestische punten, d.w.z. dat de E1%,1cm-waarde bij deze golflengte onafhankelijk is van de pH. Deze golflengtes liggen op de helling van het spectrum. De hieruit berekende gehalten zijn dan ook slechts indicatief en geven geen uitsluitel over de zuiverheid en/of het gehalte van de standaard.



In bijlage F is een spectrum opgenomen van Th.HCl. Het gehalte van de standaard werd in 3-voud gecontroleerd na drogen boven fosforpentoxide tot constant gewicht (vochtverlies  $\pm 3,5\%$ ). Na oplossen van een bekende hoeveelheid gedroogde standaard in  $0,1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  en verdunnen tot een concentratie van  $10,0 \text{ }\mu\text{g/ml}$ , werd spectrofotometrisch de extinctie bepaald en hieruit het gehalte berekend aan de hand van de  $E_{1\%,1\text{cm}}$ -waarde.

Tabel 11: Resultaten van de extinctiemetingen bij de golflengten 246, 273 en 236 nm en de daaruit berekende gehalten van de standaard Th.HCl (BDH no.44005). Metingen zijn uitgevoerd op Beckman DU-40 in 1 cm cuvet t.o.v.  $0,1 \text{ M}$  zwavelzuur.

concentratie	E246	gehalte	E273	gehalte	E236	gehalte
berekend uit		berekend		berekend		berekend
inweeg		uit E266		uit E273		uit E236
10,0 $\mu\text{g/ml}$	0,462	97,0%	0,254	113,9%	0,373	102,7%
10,0 $\mu\text{g/ml}$	0,460	96,5%	0,246	110,3%	0,381	104,9%
10,0 $\mu\text{g/ml}$	0,468	98,2%	0,241	108,1%	0,396	109,0%

Uit de resultaten (tabel 11) blijkt dat het gehalte bepaald in het maximum bij 246 nm gemiddeld 97,2% bedraagt en dat de gehalten berekend uit de extincties bij de isobestische punten inderdaad sterk variëren.

#### 5.1.4 Zuiverheid thiaminemonofosfaat

Volgens de literatuur (lit. 5) komen de spectra van thiamine en de esters hiervan overeen. Dit betekent dat aan de hand van de molecuul-massa de  $E_{1\%,1\text{cm}}$ -waarden berekend kunnen worden (zie tabel 8). Voor de discussie omtrent de isobestische punten, zie 5.1.3.

In bijlage F is een spectrum opgenomen van thiaminemonofosfaat. $2\text{H}_2\text{O}$ . Het gehalte werd in 3-voud gecontroleerd na drogen boven fosforpentoxide tot constant gewicht (vochtverlies  $0,3\text{--}2,9\%$ ). Na oplossen van

een bekende hoeveelheid gedroogde standaard in 0,1 M  $H_2SO_4$  en verdunnen tot een concentratie van 10,0  $\mu g/ml$ , werd spectrofotometrisch de extinctie bepaald en hieruit het gehalte berekend aan de hand van de  $E_{1\%,1cm}$ -waarde.

Tabel 12: Resultaten van de extinctiemetingen bij de golflengten 246, 273 en 236 nm en de daaruit berekende gehalten van de standaard TMP. $2H_2O$  (Fluka no.88340). Metingen zijn uitgevoerd op Beckman DU-40 in 1 cm cuvet t.o.v. 0,1M zwavelzuur.

concentratie	E246	gehalte	E273	gehalte	E236	gehalte
berekend uit		berekend		berekend		berekend
inweeg		uit E266		uit E273		uit E236
10,0 $\mu g/ml$	0,354	102,9%	0,175	86,6%	0,293	111,5%
10,0 $\mu g/ml$	0,340	98,8%	0,164	81,2%	0,282	107,6%
10,0 $\mu g/ml$	0,345	100,3%	0,158	78,2%	0,291	111,1%

Uit de resultaten (tabel 12) blijkt dat het gehalte bepaald in het maximum bij 246 nm gemiddeld 100,7% bedraagt en dat de gehalten berekend uit de extincties bij de isobestische punten inderdaad sterk variëren en daardoor zouden wijzen op onzuiverheid van deze standaard. Ook vindt geen verschuiving plaats van de golflengte in het maximum vergeleken met die van Th.HCl, zodat ook hier de aanname waarschijnlijk terecht is dat de spectra overeenkomen en dat de extinctie bepaald wordt door het gehalte (berekend aan de hand van de molecuulmassa 72,16%) thiamine in thiaminefosfaat.

## 5.2 Houdbaarheid stock- en werkoplossingen

Volgens de literatuur zijn de stock-oplossingen van de standaarden Rb, FMN, Th en TMP gedurende langere tijd houdbaar in zuur milieu, mits koel en donker bewaard. Aangezien de zure hydrolyse plaatsvindt in 0,1 M zwavelzuur ligt oplossen van de standaarden in dit milieu ook voor de hand. Het is wenselijk om ook de werkoplossingen (concentratie =10,0  $\mu g/ml$ ) gedurende enige tijd, bijv. 1 maand te kunnen bewaren.

Daartoe werden volgens onderstaande procedures stock- en werkoplossingen gemaakt en spectrofotometrisch gemeten. Na een maand bewaring in de koelkast werd dezelfde werkoplossing opnieuw gemeten en werd ook een nieuwe verdunning gemaakt uit de eveneens in de koelkast bewaarde stock-oplossing en gemeten. Dit experiment werd gedurende een half jaar uitgevoerd. De resultaten staan vermeld in tabel 13.

Tabel 13: Resultaten van de maandelijkse extinctiemetingen bij de aangegeven golflengte van de standaarden Rb, FMN, Th en TMP van de stock-oplossing na verdunnen en de werkoplossing (onderstreept) gedurende een maand bewaring voor de aangegeven bewaartijd van de stock-oplossing. Metingen zijn uitgevoerd op Beckman DU-40 in 1 cm cuvet t.o.v. 0,1M zwavelzuur.

bewaartijd in maanden	Rb		FMN		Th	TMP
	E266	E222	E266	E222	E246	E246
0	0,844	0,760	0,621	0,560	0,462	0,354
	<u>0,834</u>	<u>0,734</u>	<u>0,612</u>	<u>0,533</u>	<u>0,470</u>	<u>0,354</u>
1	0,839	0,751	0,617	0,555	0,460	0,351
	<u>0,837</u>	<u>0,747</u>	<u>0,615</u>	<u>0,545</u>	<u>0,467</u>	<u>0,354</u>
2	0,832	0,741	0,620	0,558	0,470	0,360
	<u>0,858</u>	<u>0,780</u>	<u>0,627</u>	<u>0,563</u>	<u>0,465</u>	<u>0,354</u>
3	0,847	0,776	0,622	0,568	0,461	0,350
	<u>0,841</u>	<u>0,742</u>	<u>0,625</u>	<u>0,557</u>	<u>0,465</u>	<u>0,347</u>
4	0,845	0,758	0,628	0,565	0,454	0,355
	<u>0,837</u>	<u>0,744</u>	<u>0,622</u>	<u>0,562</u>	<u>0,466</u>	<u>0,351</u>
5	0,836	0,760	0,626	0,569	0,460	0,349
	<u>0,834</u>	<u>0,751</u>	<u>0,615</u>	<u>0,557</u>	<u>0,463</u>	<u>0,357</u>



Vervolg tabel 13.

bewaartijd in maanden	Rb		FMN		Th	TMP
	E266	E222	E266	E222	E246	E246
7	0,829	0,746	0,611	0,550	0,462	0,356
11	0,842	0,760	0,624	0,572	0,460	0,350
14			0,623	0,538	0,455	0,358

Uit deze resultaten blijkt dat de werkoplossingen van de standaarden (concentratie 10,0 µg/ml) gedurende minimaal een maand houdbaar zijn. De verschillen zijn ca. 1% t.o.v. de niet-bewaarde oplossingen. Ook de stockoplossingen zijn stabiel gedurende minimaal een half jaar, zodat niet bij elke serie een verse standaard (-oplossing) gebruikt hoeft te worden.

### 5.3 Procedure en criteria voor de standaardoplossingen

In deze paragraaf zullen de procedures voor de bereiding van de stock- en werkoplossingen van de standaarden en voor de houdbaarheid ervan en de criteria voor de zuiverheid worden vastgelegd.

Alle werkzaamheden dienen onder uitsluiting van zon- en/of daglicht te gebeuren. Oplossingen van de standaarden dienen gemaakt te worden in bruin glaswerk. Alle standaarden worden gedroogd boven fosforpentoxide tot constant gewicht, vervolgens opgelost en verdund in 0,1 M zwavelzuur en spectrofotometrisch gemeten t.o.v. 0,1 M zwavelzuur (Beckman DU-40, 1 cm cuvet). Bewaring van de werkoplossing vindt plaats in de koelkast gedurende maximaal één maand, van de stock-oplossing gedurende maximaal een half jaar. De verblijftijd buiten de koelkast dient zo kort mogelijk te zijn en onder uitsluiting van zon- of daglicht.

Riboflavine. Weeg 50,0 mg gedroogde standaard (BDH no.44088) af in een maatkolf van 1000 ml, los op in 0,1 M zwavelzuur eventueel onder verwarmen tot max. 60°C, koel af, vul aan en meng (stock-oplossing

50,0 µg/ml). Verdun met 0,1 M zwavelzuur tot 10,0 µg/ml (=werkoplossing) en neem een spectrum op (200-600 nm). De gemeten extinctie in het maximum bij 266 nm moet >0,830 en de verhouding E222/E266 moet <0,95 zijn. Dit betekent dat het gehalte in de vaste stof >97,6% is, berekend met de theoretische E1%,1cm-waarde.

Riboflavinemonofosfaat. Weeg 50,0 mg gedroogde standaard (Fluka no.83810) af in een maatkolf van 500 ml, los op in 0,1 M zwavelzuur, vul aan en meng (stock-oplossing 100,0 µg/ml). Verdun met 0,1 M zwavelzuur tot 10,0 µg/ml (=werkoplossing) en neem een spectrum op (200-600 nm). De gemeten extinctie in het maximum bij 266 nm moet >0,610 en de verhouding E222/E266 moet <0,95 zijn. Dit betekent dat het gehalte in de vaste stof >98,1% is, berekend met de theoretische E1%,1cm-waarde.

Thiamine. Weeg 56,2 mg gedroogde standaard (Thiaminehydrochloride BDH no.44005) af in een maatkolf van 500 ml, los op in 0,1 M zwavelzuur, vul aan en meng (stock-oplossing 100,0 µg/ml berekend voor thiamine). Verdun met 0,1 M zwavelzuur tot 10,0 µg/ml (=werkoplossing) en neem een spectrum op (200-300 nm). De gemeten extinctie in het maximum bij 246 nm moet >0,460 zijn. Dit betekent dat het gehalte in de vaste stof >96,5% is, berekend met de theoretische E1%,1cm-waarde.

Thiaminefosfaat. Weeg 50,0 mg gedroogde standaard (Fluka no.88340) af in een maatkolf van 500 ml, los op in 0,1 M zwavelzuur, vul aan en meng (stock-oplossing 100,0 µg/ml). Verdun met 0,1 M zwavelzuur tot 10,0 µg/ml (=werkoplossing) en neem een spectrum op (200-300 nm). De gemeten extinctie in het maximum bij 246 nm moet >0,340 zijn. Dit betekent dat het gehalte in de vaste stof >98,9% is, berekend met de theoretische E1%,1cm-waarde.

## 6 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

Uit de resultaten van de toepassing van de analysemethode voor de simultane bepaling van vitamine B<sub>1</sub> en vitamine B<sub>2</sub> in hoofdstuk 4 kan geconcludeerd worden dat de methode op de meeste punten voldoet aan de gestelde eisen. Er is een stabiel en betrouwbaar chromatografisch systeem verkregen en de gewenste ondergrens van 0,01 mg/100 gram voor beide vitamines is voldoende haalbaar.



De variatiecoëfficiënt van de analysemethode bedraagt voor vitamine B<sub>1</sub> 2,4% en voor vitamine B<sub>2</sub> 2,7%.

De recovery van de addities van Rb, FMN, Th en TMP aan verschillende types monstermateriaal is goed. Voor Rb bedraagt de recovery gemiddeld 106%, voor FMN gemiddeld 86%, voor Th gemiddeld 101% en voor TMP gemiddeld 99%. Dat de recovery van FMN slechts 86% bedraagt, komt door dat door autoclaveren al een gedeelte van FMN afgebroken wordt. Een beschermende werking van de matrix kan een verklaring zijn voor de hoge recovery van Rb en FMN vergeleken met een standaard zonder matrix.

Voor de genoemde probleemmonsters bij de bepaling van thiamine (zuurkool, grapefruitsap en rode kool) kunnen nog een aantal mogelijke verbeteringen nader onderzocht worden. Te denken valt hierbij aan een verlaging van de bijdrage aan de piekverbreding door de postcolumn-reactor, waardoor de resolutie beter kan worden.

Het verloop van de standaardlijn voor riboflavine in de tijd, bij een serie meer dan 20 monsterextracten, zou in positieve zin beïnvloed kunnen worden door de temperatuur van de standaard- en dus ook van de monsteroplossing in de vials van de injectieautomaat te verlagen door gebruik te maken van een gekoelde tray. Ook verlaging van de pH van het extract voor injectie zou een positieve bijdrage hieraan kunnen leveren.

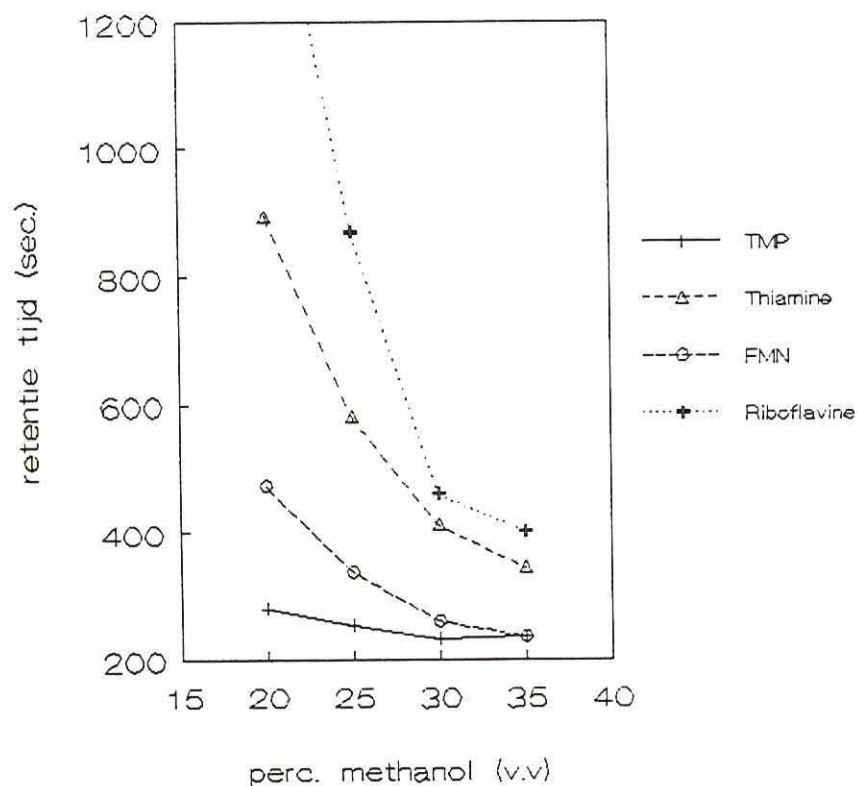
Nader onderzoek naar de extractie lijkt ook gerechtvaardigd gezien de lage recovery van met name FMN en gezien het feit dat de autoclaaf procedure nogal rigoreus is voor de ontsluiting van het monstermateriaal voor vitamine B<sub>2</sub>. Mogelijkheden die hierbij voor de hand liggen zijn verwarming van het zure extract tot maximaal 100°C, in combinatie met een enzymatische hydrolyse of zelfs een extractie bij kamertemperatuur met enzymatische hydrolyse.

Uit de experimenten aangaande de zuiverheid en de stabiliteit van de gebruikte standaarden en standaardoplossingen met behulp van spectrale gegevens blijkt dat dit een goede methode is om het niveau van de standaarden te waarborgen. Voor de controle van het niveau van de totale analyseprocedure blijft uiteraard de behoefte bestaan aan referentiematerialen met een gecertificeerd gehalte.

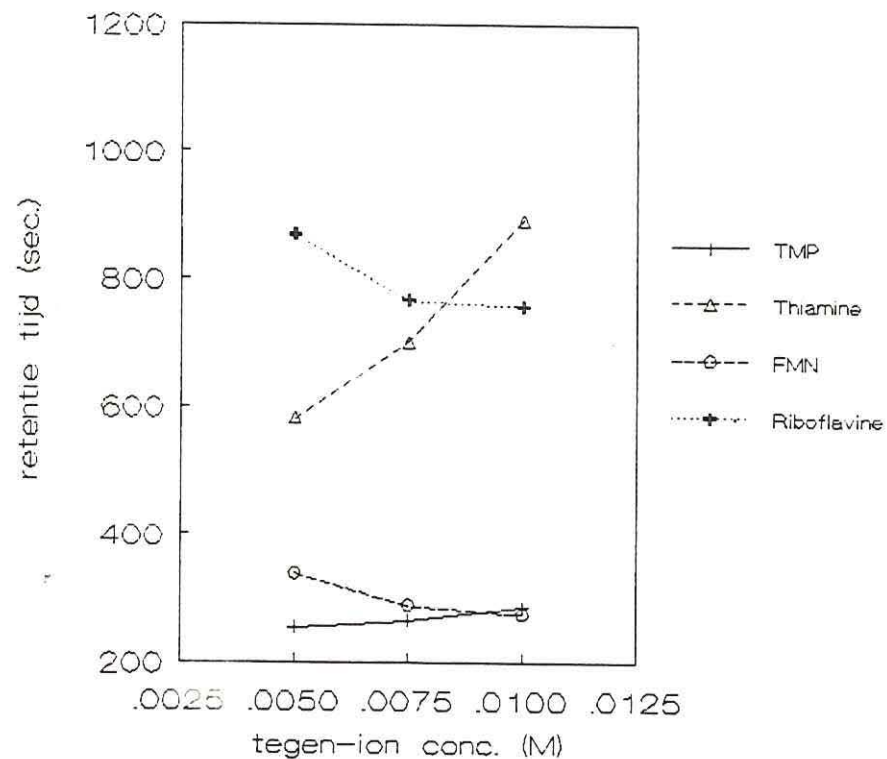
## 7 LITERATUUR

1. Hollman P.C.H., RIKILT-rapport 86.114, Literatuuronderzoek naar HPLC-methoden voor de bepaling van vitamine B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub>.
2. Wielders J.P.M., Mink C.J.K., Quantitative analysis of total thiamine in human blood, milk and cerebrospinal fluid by reversed phase ion pair HPLC, J. Chromatogr. 227, 145 (1983).
3. Horwitz, W. (ed). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13th edition Washington, AOAC, 1980, p 740-743.
4. Bognar A., Bestimmung von Riboflavin und Thiamine in Lebensmitteln mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC), Dtsch. Lebensm. Rundsch, 77, 431, (1981).
5. Strohecker R., Henning H.M., Vitamin Bestimmungen, Weinheim Verlag Chemie GmbH, 1963, s 68-126.
6. EEG- voorschrift, Bestimmung von Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>), Chemische Methode, 1967, 1323/4/VI/67-D.

grafiek 1



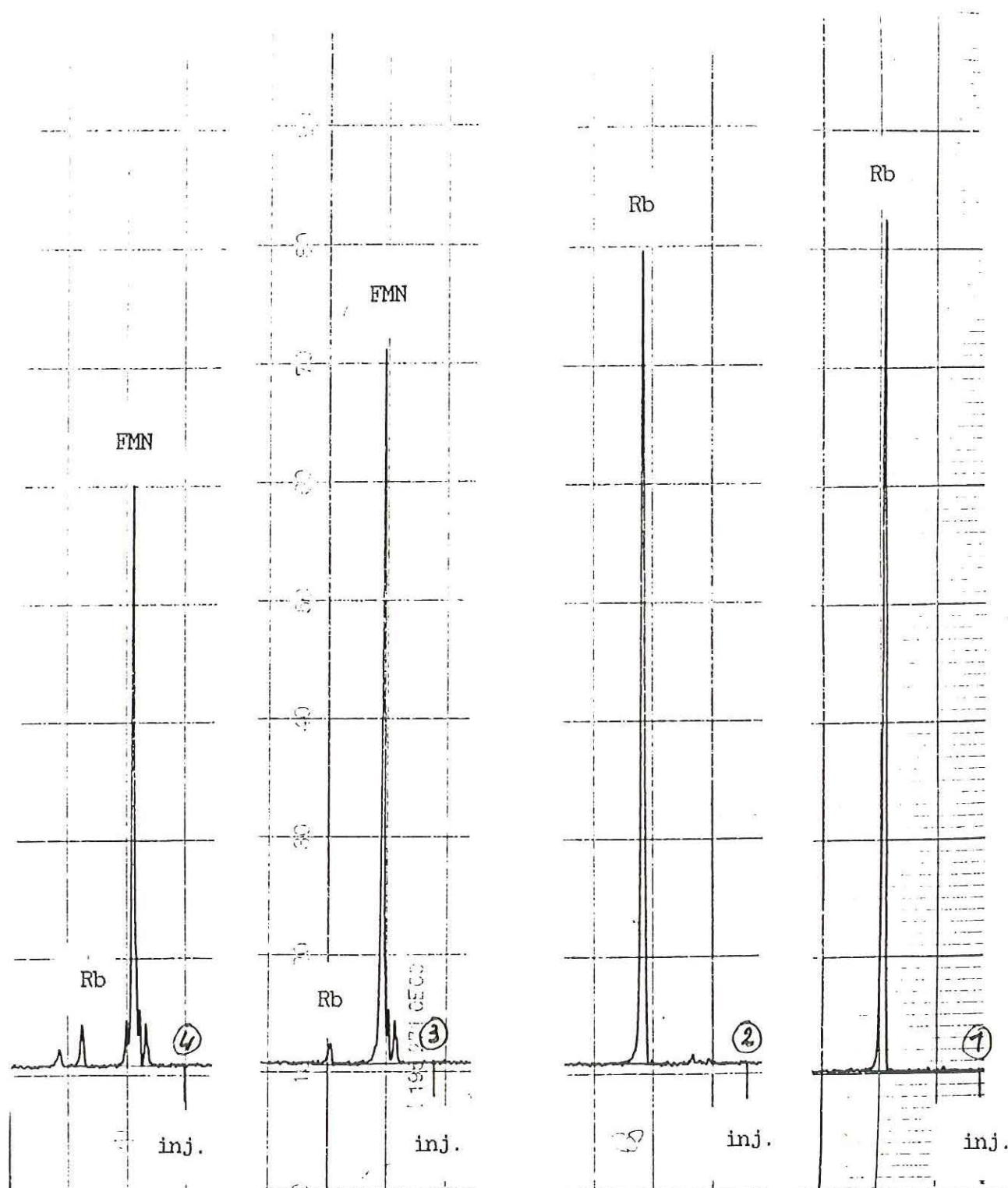
grafiek 2



De retentietijd in secondes van de componenten riboflavine, riboflavinemonofosfaat (FMN), thiamine en thiaminemonofosfaat (TMP) als functie van het methanolpercentage (v/v) in het eluens (grafiek 1) bij een tegenion-concentratie van 0,0075 M en als functie van de tegenion-concentratie in het eluens (grafiek 2) bij een methanolpercentage van 25% (v/v).

Voor overige condities zie paragraaf 2.2.





De invloed van de autoclaafbehandeling van de werkstandaard riboflavine (Rb) en riboflavinemonofosfaat (FMN). Chromatogram 1 en 3 zonder autoclaafbehandeling, chromatogram 2 en 4 met autoclaafbehandeling. Voor overige condities zie paragraaf 3.2.

CONCEPT

Intern analysevoorschrift

VOEDINGSMIDDELEN - DE SIMULTANE BEPALING VAN VITAMINE B<sub>1</sub> EN VITAMINE B<sub>2</sub> -HPLC

Opgesteld door : J.H. Slangen

Goedgekeurd door: ir P.C.H. Hollman

1 DOEL EN TOEPASBAARHEID

1.1 Toelichting

Dit analysevoorschrift is geschikt voor de bepaling van vitamine B<sub>1</sub> (thiaminechloride) en vitamine B<sub>2</sub> (riboflavine) in enkelvoudige en samengestelde voedingsmiddelen

1.2 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens voor thiaminechloride en riboflavine in de meetoplossing bedraagt 0,0008 µg/ml; dit komt overeen met een gehalte in het monster van 0,0015 mg/100 gram.

1.3 Bepaalbaarheidsgrens

De bepaalbaarheidsgrens voor thiaminechloride en riboflavine in de meetoplossing bedraagt 0,0015 µg/ml; dit komt overeen met een gehalte in het monster van 0,0030 mg/100 gram.

2 DEFINITIE

Dit voorschrift beschrijft de methode voor de simultane bepaling van vitamine B<sub>1</sub> als thiaminechloride en vitamine B<sub>2</sub> als riboflavine in voedingsmiddelen.

3 BEGINSEL

Een bekende hoeveelheid monstermateriaal wordt in een autoclaaf in zwavelzuurmilieu gehydrolyseerd. Vervolgens worden de fosforzure esters enzymatisch met Takadiastase gehydrolyseerd tot de vrije vorm.

Na scheiding op een RP-18-ionpaar-chromatografisch systeem wordt riboflavine fluorimetrisch bepaald (excitatiegolflengte 468 nm, emissiegolflengte 520 nm) en thiamine on-line gederivatiseerd tot thiochroom en fluorimetrisch bepaald (excitatiegolflengte 368 nm, emissiegolflengte 420 nm). Het gehalte aan riboflavine en thiaminechloride in het monster wordt berekend aan de hand van een ijklijn, verkregen door analyse van standaarden

#### 4 PRECISIE

##### 4.1 Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de berekende concentraties van thiaminechloride en riboflavine in de meetoplossing van twee bepalingen in hetzelfde laboratoriummonster gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden door dezelfde persoon, dient voor thiaminechloride en riboflavine niet groter te zijn dan 6,6% resp. 7,5% van de gemiddelde waarde.

##### 4.2 Reproduceerbaarheid

Niet bekend

#### 5 REAGENTIA EN HULPSTOFFEN

Alle chemicaliën dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of gelijkwaardig, tenzij anders vermeld. Gebruik gedemineraliseerd water of water van gelijkwaardige kwaliteit, tenzij anders vermeld. Alle werkzaamheden dienen onder uitsluiting van zon- en/of daglicht te gebeuren. Oplossingen van de standaarden thiaminechloride, riboflavine, thiaminemonofosfaat en riboflavinemonofosfaat dienen gemaakt te worden in bruin glaswerk en bewaard te worden bij een temperatuur van 4-8°C. De verblijftijd buiten de koelkast dient zo kort mogelijk te zijn.

5.1 Zwavelzuur 95-97% (m/v) (bv. Merck no.731)

5.2 Natriumacetaat-trihydraat (bv. Merck no.6267)

5.3 Takadiastase (Fluka no.86250)



- 5.4 Kaliumdihydrogeenfosfaat (bv. Merck no.4873)
- 5.5 n-Heptaansulfonzuur-natriumzout-monohydraat (bv. Serva no.24604)
- 5.6 Tetra-ethyl-ammoniumchloride-monohydraat (bv. Merck no.822148)
- 5.7 o-Fosforzuur 85% (m/v) (bv. Merck no.573)
- 5.8 Methanol (bv. Merck no.6009)
- 5.9 Kaliumhydroxide 85% (m/m) (bv. Merck no.5033)
- 5.10 Kaliumhexacyanoferraat (III) (bv. Merck no.4973)
- 5.11 Riboflavine (BDH no.44088), gedroogd boven fosforpentoxide tot constant gewicht.
- 5.12 Riboflavine-monofosfaat (Fluka no.83810), gedroogd boven fosforpentoxide tot constant gewicht.
- 5.13 Thiaminechloride-hydrochloride (BDH no.44005), gedroogd boven fosforpentoxide tot constant gewicht.
- 5.14 Thiamine-monofosfaat (Fluka no.88340), gedroogd boven fosforpentoxide tot constant gewicht.
- 5.15 Water pro HPLC (bv. water gereinigd over een Milli-Q installatie, Millipore)
- 5.16 Zwavelzuur 0,1 M
- 5.17 Zwavelzuur 0,2 M
- 5.18 Zwavelzuur 2 M
- 5.19 Natriumacetaat-trihydraat 2,5 M

5.20 Takadiastase 20% (m/v). Bereid dagelijks vers.

5.21 Zwavelzuur-natriumacetaat buffer. Breng 250 ml zwavelzuur 2 M (5.18) met natriumacetaat-trihydraat 2,5 M (5.19) op pH 4,0 en vul aan tot 1 liter.

5.22 Fosforzuur/water 1+1 (v/v)

5.23 Kaliumhydroxide 50% (m/v)

5.24 Thiochroom-reagens. Los 0,14 g kaliumhexacyanoferraat III (5.10) op in ca 100 ml water pro HPLC (5.15), voeg toe 65 ml kaliumhydroxide 50% (5.23) en vul aan met water pro HPLC (5.15) tot 200 ml. Bereid deze oplossing dagelijks vers.

5.25 HPLC-eluens. Los 8,58 g kaliumhydrogeenfosfaat (5.4), 1,55 g n-heptaansulfonzuur-natriumzout-monohydraat (5.5) en 1,378 g tetraethyl-ammoniumchloride-monohydraat (5.6) op in ca 400 ml water pro HPLC (5.15), breng op pH 3,5 met fosforzuur/water (5.22), voeg toe 300 ml methanol Lichrosolv (5.8) vul aan tot 1 liter met water pro HPLC (5.15), en meng. Filtreer over 0,45 micron filter.

5.26 Hoofdstandaardoplossing riboflavine (50 µg/ml).

Weeg 50,0 mg gedroogde standaard riboflavine (5.11) af en breng over met behulp van zwavelzuur 0,1 M (5.16) in een maatkolf van 1000 ml. Los eventueel onder verwarmen tot max. 60°C op, koel af, vul aan met zwavelzuur 0,1 M (5.16) en meng. Deze oplossing is gedurende 6 maanden houdbaar in de koelkast. Voor batch-contrôle zie RSV F-0016.

5.27 Werkstandaard riboflavine.

Verdun de hoofdstandaardoplossing riboflavine (5.26) met 0,1 M zwavelzuur (5.16) tot 10,0 µg/ml. Deze oplossing is gedurende 1 maand houdbaar in de koelkast. Voor batch-contrôle zie RSV F-0016.

5.27.1 Controle zuiverheid en gehalte van de standaard riboflavine. Meet met de spectrofotometer (6.12) de extinctie van de maxima bij ca 222 nm en bij ca 266 nm van de werkstandaard riboflavine (5.27) ten opzichte van zwavelzuur 0,1 M (5.16). De gemeten extinctie in het maximum bij ca 266 nm moet  $>0,830$  en de verhouding  $E_{222}/E_{266}$  moet  $<0,95$  zijn. Indien aan deze voorwaarden niet voldaan wordt is de standaard ongeschikt en dient een nieuwe hoofdstandaardoplossing gemaakt te worden.

5.28 Hoofdstandaardoplossing riboflavinemonofosfaat (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Weeg 50,0 mg gedroogde standaard riboflavinemonofosfaat (5.12) af en breng over met behulp van zwavelzuur 0,1 M (5.16) in een maatkolf van 500 ml. Los op, vul aan met zwavelzuur 0,1 M (5.16) en meng. Deze oplossing is gedurende 6 maanden houdbaar in de koelkast. Voor batchcontrole zie RSV F-0016.

5.29 Werkstandaard riboflavinemonofosfaat.

Verdun de hoofdstandaardoplossing riboflavinemonofosfaat (5.28) met 0,1 M zwavelzuur (5.16) tot 10,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Deze werkstandaard is gedurende 1 maand houdbaar in de koelkast. Voor batchcontrole zie RSV F-0016.

5.29.1 Controle zuiverheid en gehalte van de standaard riboflavinemonofosfaat. Meet met de spectrofotometer (6.12) de extinctie van de maxima bij ca 222 en bij ca 266 nm van de werkstandaard riboflavinemonofosfaat (5.29) ten opzichte van zwavelzuur 0,1 M (5.16). De gemeten extinctie in het maximum bij ca 266 nm moet  $>0,610$  en de verhouding  $E_{222}/E_{266}$  moet  $<0,95$  zijn. Indien aan deze voorwaarden niet voldaan wordt is de standaard ongeschikt en dient een nieuwe hoofdstandaardoplossing gemaakt te worden.

5.30 Hoofdstandaardoplossing thiaminechloride (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Weeg 56,2 mg gedroogde standaard thiaminechloride-hydrochloride (5.13) af en breng over met behulp van zwavelzuur 0,1 M (5.16) in een maatkolf van 500 ml. Los op, vul aan met zwavelzuur 0,1 M (5.16) en meng. Deze oplossing is gedurende 6 maanden houdbaar in de koelkast. Voor batchcontrole zie RSV F-0016.



### 5.31 Werkstandaard thiaminechloride.

Verdun de hoofdstandaardoplossing thiaminechloride (5.30) met 0,1 M zwavelzuur (5.16) tot 10,0 µg/ml. Deze werkstandaard is gedurende 1 maand houdbaar in de koelkast. Voor batch-controle zie RSV F-0016.

#### 5.31.1 Controle zuiverheid en gehalte van de standaard thiaminechloride.

Meet met de spectrofotometer (6.12) de extinctie van het maximum bij ca 246 nm van de werkstandaard thiaminechloride (5.31) ten opzichte van zwavelzuur 0,1 M (5.16). De gemeten extinctie in het maximum bij ca 246 nm moet >0,460 zijn. Indien aan deze voorwaarde niet voldaan wordt is de standaard ongeschikt en dient een nieuwe hoofdstandaardoplossing gemaakt te worden.

### 5.32 Hoofdstandaardoplossing thiaminemonofosfaat (100 µg/ml).

Weeg 50,0 mg gedroogde standaard thiaminemonofosfaat (5.14) af en breng over met behulp van zwavelzuur 0,1 M (5.16) in een maatkolf van 500 ml. Los op, vul aan met zwavelzuur 0,1 M (5.16) en meng. Deze oplossing is gedurende 6 maanden houdbaar in de koelkast. Voor batch-controle zie RSV F-0016.

### 5.33 Werkstandaard thiaminemonofosfaat.

Verdun de hoofdstandaardoplossing thiaminemonofosfaat (5.32) met 0,1 M zwavelzuur (5.16) tot 10,0 µg/ml. Deze oplossing is gedurende 1 maand houdbaar in de koelkast. Voor batch-controle zie RSV F-0016.

#### 5.33.1 Controle zuiverheid en gehalte van de standaard thiaminemonofosfaat.

Meet met de spectrofotometer (6.12) de extinctie van het maximum bij ca 246 nm van de werkstandaard thiaminemonofosfaat (5.33) ten opzichte van zwavelzuur 0,1 M (5.16). De gemeten extinctie in het maximum bij ca 246 nm moet >0,340 zijn. Indien aan deze voorwaarde niet voldaan wordt is de standaard ongeschikt en dient een nieuwe hoofdstandaardoplossing gemaakt te worden.

## 6 APPARATUUR EN HULPMIDDELEN

### 6.1 Analytische balans

6.2 Bovenweger met een weegbereik van 0 tot 200 gram met een afleesnauwkeurigheid van 0,01 g

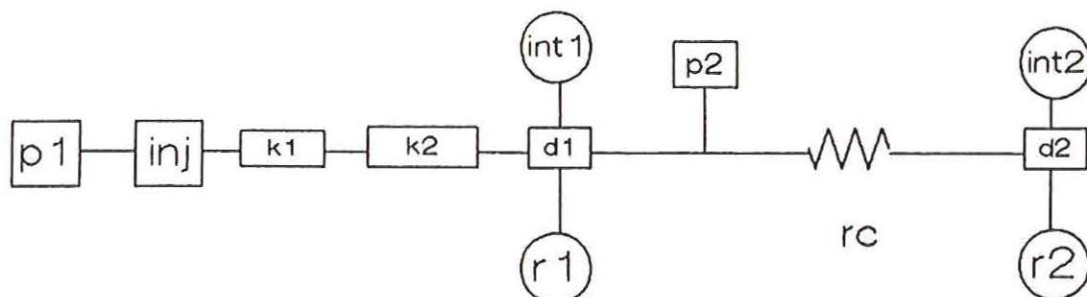
6.3 Autoclaaf 120°C

6.4 Stoof 45°C

6.5 pH-meter, minimale nauwkeurigheid 0,05 pH-eenheid

6.6 Waring Blendor met roestvaststalen of glazen maalbekers

6.7 HPLC opstelling volgens schema bestaande uit:



6.7.1  $P_1$ =HPLC-pomp, Waters type 590, flow 1,0 ml/min

6.7.2 Inj=Injectieautomaat, Perkin Elmer type ISS-100, loop 200  $\mu$ l, injectievolume 20  $\mu$ l

6.7.3  $K_1$ =Voorkolom, Waters no.84550, 20x4,0 mm, gevuld met Perisorb RP-18, Merck no.10437, deeltjesgrootte 30-40  $\mu$ m

6.7.4  $K_2$ =Analytische kolom, Hypersil-5-ODS, 250x4,6 mm, deeltjesgrootte 5  $\mu$ m, Chrompack no.28820

6.7.5  $D_1$  = Fluorescentiedetector t.b.v. riboflavine, Perkin Elmer type LS-4, excitatiegolflengte 468 nm, emissiegolflengte 520 nm, spectrale bandbreedte excitatie 15 nm, spectrale bandbreedte emissie 20 nm, meetcel 3  $\mu$ l.

6.7.6  $R_1$  = Recorder t.b.v. riboflavine, Kipp en Zonen type BD-40, meetbereik 10 mV, papiersnelheid 0,2 cm/min

6.7.7  $I_1$  = Integrator t.b.v. riboflavine, bv. Apple IIe computer voorzien van Chromatochart en Chromadapt

6.7.8  $P_2$  = Reagenspomp, flow 0,1 ml/min, Technicon III

6.7.9 RC = Reactiespiraal, Teflon, lengte 150 cm, inwendige diameter 0,5 mm, inwendige diameter spiraal 4 cm

6.7.10  $D_2$  = Fluorescentiedetector t.b.v. thiochroom, Hitachi type F-1000, meetcel 12  $\mu$ l, excitatiegolflengte 368 nm, emissiegolflengte 420 nm, inlet- en outlet-leiding van Teflon met inwendige diameter van 0,5 mm.

6.7.11  $R_2$  = Recorder t.b.v. thiochroom, Kipp en Zonen type BD-40, meetbereik 10 mV, papiersnelheid 0,2 cm/min

6.7.12  $I_2$  = Integrator t.b.v. thiochroom, bv. Spectra Physics type Minigrator

6.8 Acrodisc filters 0,45 micron (bv. Gelman no.4184)

6.9 Filtreereenheid voor eluens (bv. Millipore no.85124)

6.10 Eluensfilters 0,45 micron (bv. Millipore no.HVLP-0470)

6.11 Normaal laboratorium glaswerk, bruin



6.12 Spectrofotometer, type Beckman DU-40, geschikt voor het meten met 1 cm cuvetten; voor bediening, zie RSV T-0054.

## 7 WERKWIJZE

### 7.1 Algemeen

Analyseer alle monsters in duplo. Neem bij elke serie analysemonsters een contrôlemonster, bestaande uit de gecombineerde werkstandaarden thiaminemonofosfaat en riboflavinemonofosfaat, mee ter controle van de enzymactiviteit. Pipeteer daartoe achtereenvolgens 1000 µl werkstandaard van riboflavinemonofosfaat en 500 µl werkstandaard van thiaminemonofosfaat (5.29 resp. 5.31) samen in een erlenmeyer van 100 ml en behandel verder volgens 7.4.

### 7.2 Voorzorgsmaatregelen

Alle werkzaamheden dienen plaats te vinden onder uitsluiting van direct zonlicht en wit kunstlicht. Gebruik bruin glaswerk. Alle handelingen dienen zonder onderbreking te worden uitgevoerd. De verblijftijd buiten de koelkast van de werkstandaarden dient zo kort mogelijk te zijn.

### 7.3 Monstervoorbehandeling en inweeg

Vermaal het monstermateriaal of een representatief gedeelte daarvan met een zelfde gewicht zwavelzuur 0,2 M (5.17) in een Waring Blendor maalbeker (6.6). Indien het maalsel te "dik" blijkt te zijn wordt een extra hoeveelheid zwavelzuur 0,1 M (5.16) met bekend gewicht toegevoegd tot een homogene slurry wordt verkregen. Weeg uit de slurry in een erlenmeyer van 100 ml op een bovenweger (6.2) op 0,01 g nauwkeurig een hoeveelheid af, die naar schatting ca 2.5 µg thiaminechloride en 5 µg riboflavine bevat.

### 7.4 Ontsluiting en hydrolyse

Voeg aan de volgens 7.3 verkregen inweeg zwavelzuur 0,1 M (5.16) toe tot een totaal volume van ca 50 ml. Plaats gedurende 30 minuten in een

autoclaaf (6.3) en koel af. Breng op pH 4,0 op 0,1 pH-eenheid nauwkeurig met natriumacetaat-trihydraat 2,5 M (5.19), voeg 5,0 ml zwavelzuur-natriumacetaat buffer (5.21) en 5,0 ml Takadiastase 20% (5.20) toe. Plaats gedurende 18 uur (overnacht) in een stoof bij 45°C (6.4). Koel af, spoel kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml, vul aan met water en meng. Filtreer over een 0,45 micron filter (6.8). Gebruik deze oplossing voor HPLC-analyse (7.6)

#### 7.5 Standaardlijn

Pipeteer resp. 100, 200, 400 en 500 µl van de werkstandaard thiaminechloride (5.31) en resp. 200, 500, 700 en 1000 µl van de werkstandaard riboflavine (5.27) in een erlenmeyer van 100 ml en handel verder volgens 7.4. De werkstandaarden van thiaminechloride en riboflavine van de verschillende niveaus mogen gecombineerd worden in één erlenmeyer.

#### 7.6 HPLC-analyse

Stel het systeem in werking en laat gedurende minimaal 1 uur stabiliseren. Injecteer 20 µl van de volgens 7.4 behandelde hoogste gecombineerde standaard thiaminechloride en riboflavine. Stel de detectoren zo in dat de basislijn op ca 10% van de volle schaal ligt en de standaard een uitslag geeft op de recorder van ca 80% van de volle schaal. Injecteer vervolgens deze standaardoplossing zo vaak totdat het verschil in piekhoogte van twee opeenvolgende injecties minder dan 1% bedraagt.

Injecteer nu ten behoeve van de ijklijn de 4 extracten van de volgens 7.4 verkregen gecombineerde werkstandaarden en vervolgens de extracten van het contrôlemonster (7.1) en de monsterextracten. Aan het eind van elke serie analyses dienen weer de extracten van de gecombineerde werkstandaarden geïnjecteerd te worden. Indien in een serie analyses meer dan 20 injecties van monsterextracten gaan plaats vinden moeten per 20 monsterextracten ook nog de 4 extracten van de gecombineerde werkstandaarden geïnjecteerd worden.

## 8 WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

### 8.1 Berekening

Stel voor thiaminechloride resp. riboflavine een ijklijn op aan de hand van de gevonden piekoppervlaktes van de gecombineerde werkstandaarden aan het begin van de serie analyses en een aan het eind van elke serie van maximaal 20 monsterextracten. Bereken ook de gemiddelde ijklijn. De ijklijnen dienen lineair te zijn en het verschil van de afzonderlijke ijklijnen ten opzichte van de gemiddelde ijklijn van een serie mag niet groter zijn dan 2,5%. Indien aan deze voorwaarden niet wordt voldaan, worden de analyses herhaald.

Bereken de concentratie van thiaminechloride resp. riboflavine in de monsterextracten. Houd rekening met de ij-as-afsnijding als gevolg van de blancowaarde van het enzympreparaat. Bereken het omzettingspercentage van thiaminemonofosfaat en riboflavinemonofosfaat in het controlemonster. De omrekeningsfactor thiaminemonofosfaat ---> thiaminechloride bedraagt 0,722 en voor riboflavinemonofosfaat ---> riboflavine 0,732. Het berekende omzettingspercentage voor thiaminemonofosfaat resp. riboflavinemonofosfaat moet groter zijn dan 95 resp. 80%. Indien aan deze voorwaarden niet wordt voldaan, worden de analyses herhaald. Het verschil tussen de berekende concentraties van de duplowaarden van de monsterextracten voor thiaminechloride resp. riboflavine mag niet groter zijn dan 6,6% resp. 7,5% van de gemiddelde waarde. Verder mogen de berekende concentraties niet hoger zijn dan de concentratie van de hoogste standaard. Indien aan deze voorwaarden niet wordt voldaan, wordt de analyse van betreffend(e) monster(s) herhaald, waarbij de inweeg aangepast wordt dusdanig dat de dan gevonden concentratie wel in het ijklijngebied valt.

Bereken het gehalte van het monster rekening houdend met de inweeg en de gemaakte verdunning bij de monstervoorbereiding (7.3), uitgedrukt in mg/100 gram met de volgende formule:

$$G = a \times \frac{100}{m} \times f \times \frac{1}{10} \text{ waarin}$$

G = het gehalte aan thiaminechloride resp. riboflavine in het monster uitgedrukt in mg/100 gram

a = de concentratie thiaminechloride resp. riboflavine in het monster-extract in  $\mu\text{g/ml}$

m = de inweeg uit de slurry in g

f = de verdunningsfactor uit 7.3 (meestal gelijk aan 2)

Het uiteindelijke gehalte van een monster is het gemiddelde van de gevonden duplowaarden, uitgedrukt in mg/100 gram en afgerond op 3 decimalen.

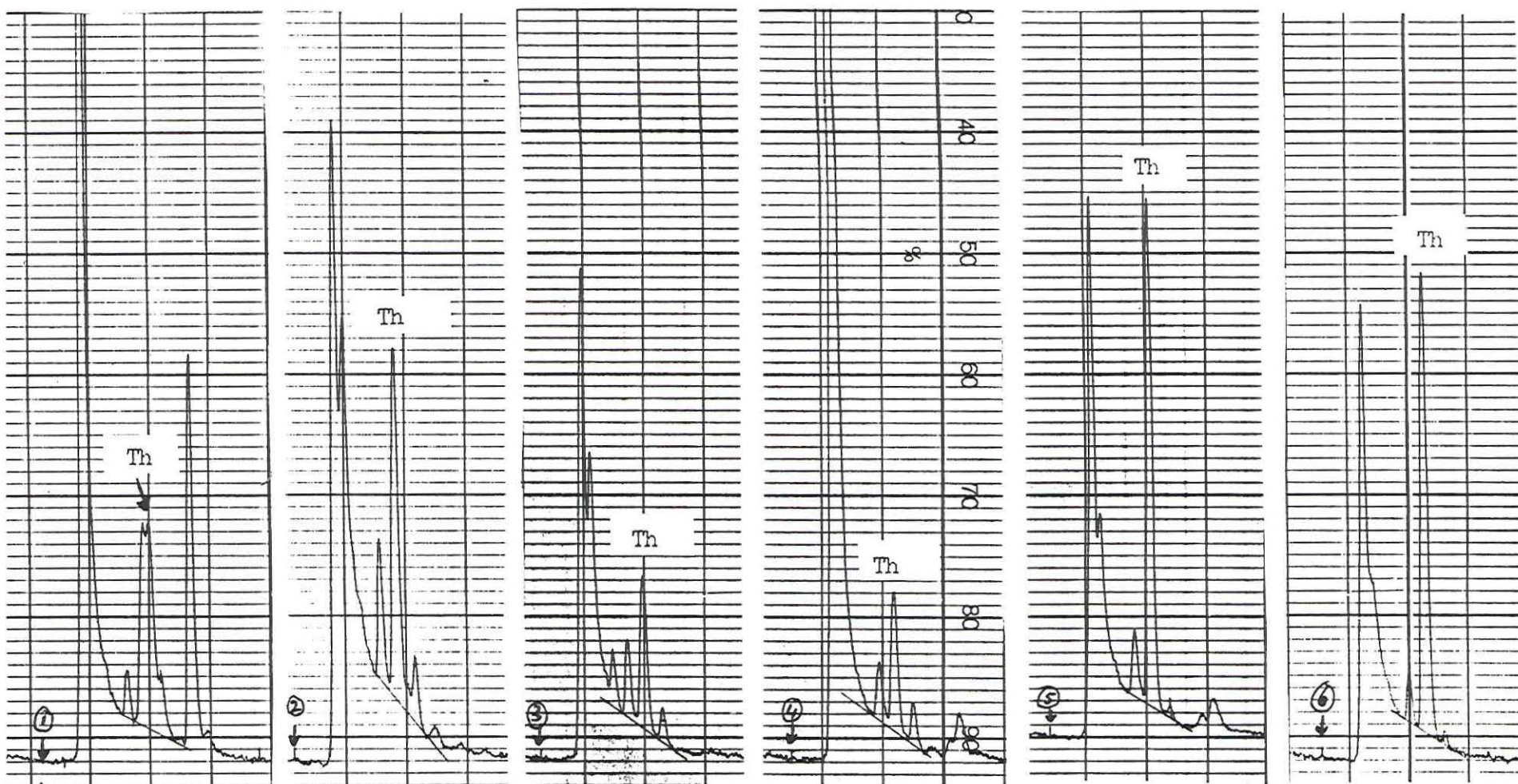
## 8.2 Registratie

Nog nader uit te werken.....

## 9 LITERATUUR

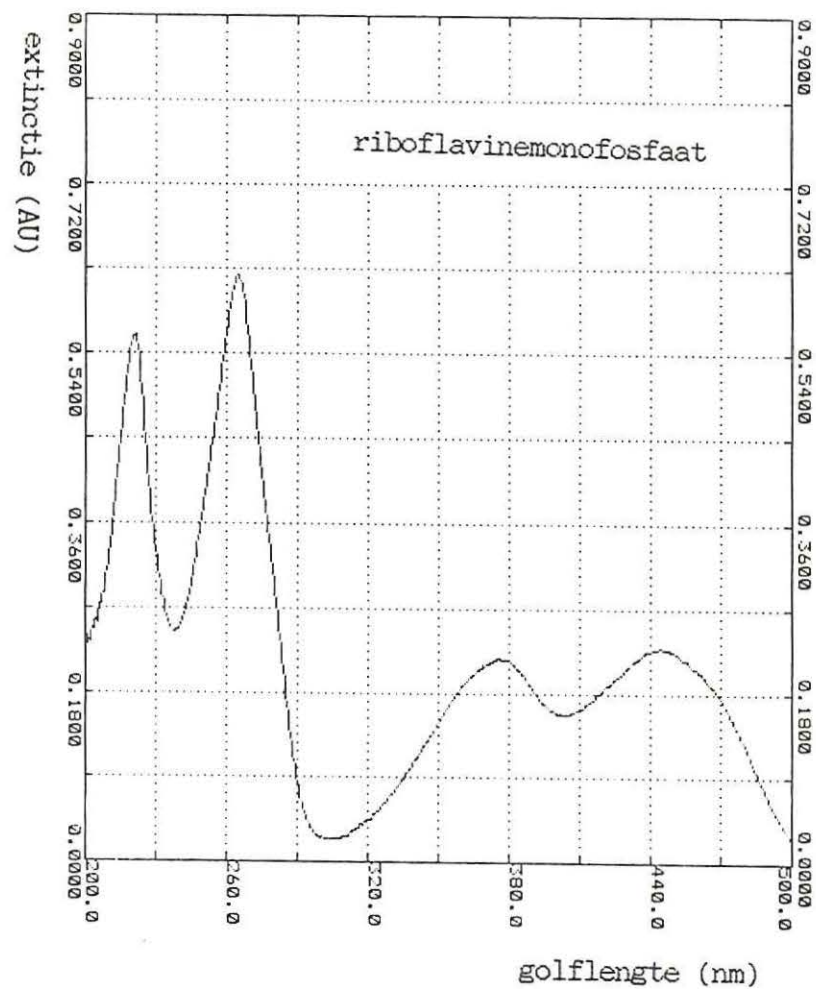
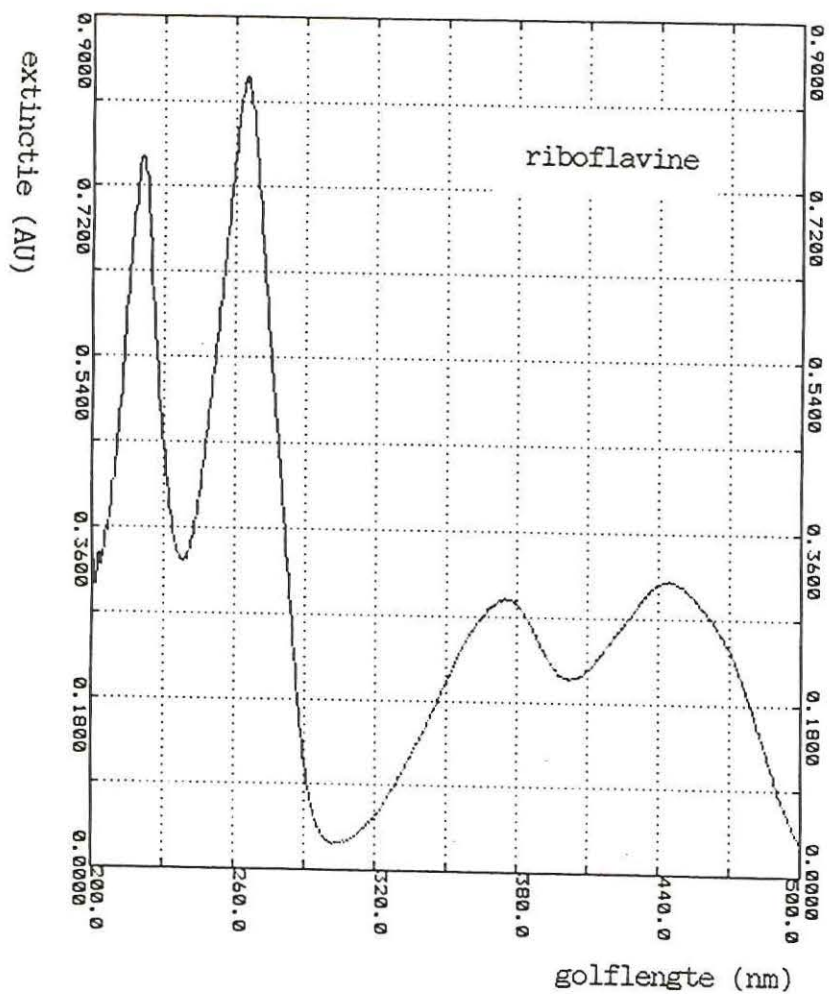
Het bijbehorend RIKILT-rapport



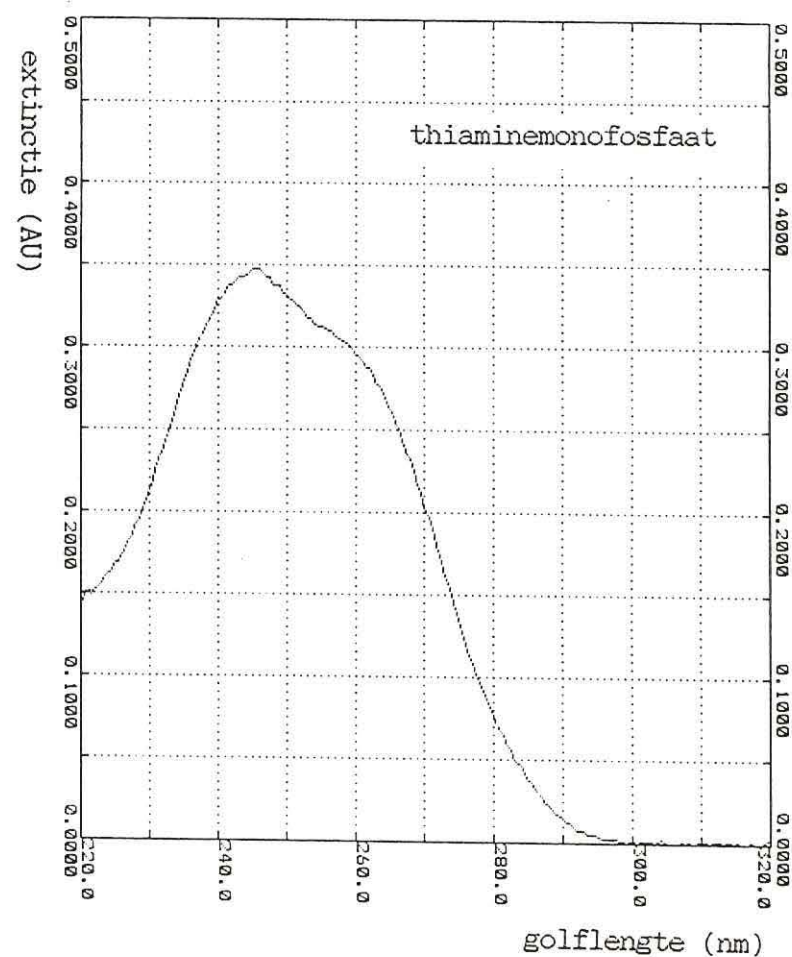
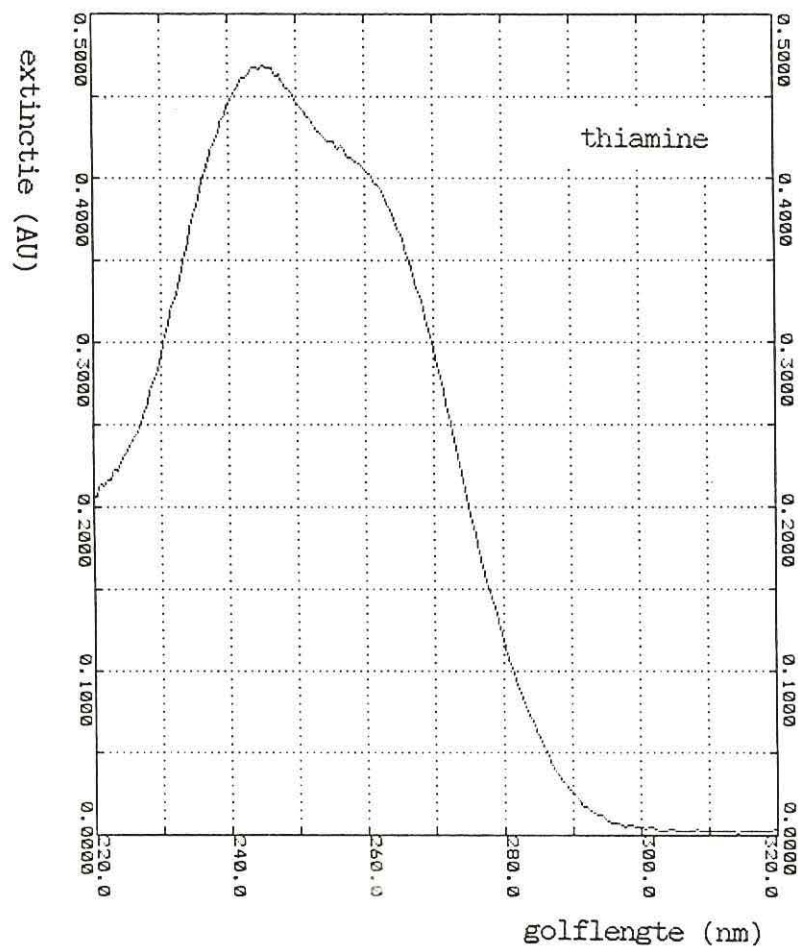


De chromatogrammen van de bepaling van vitamine B<sub>1</sub> voor de produkten mandarijn (1), kipfilet (2), banaan (3), yoghurt (4), en roggemeel (5) en voor een standaardoplossing (0,05  $\mu\text{g/ml}$ ).

Voor chromatografische condities zie hoofdstuk 4.

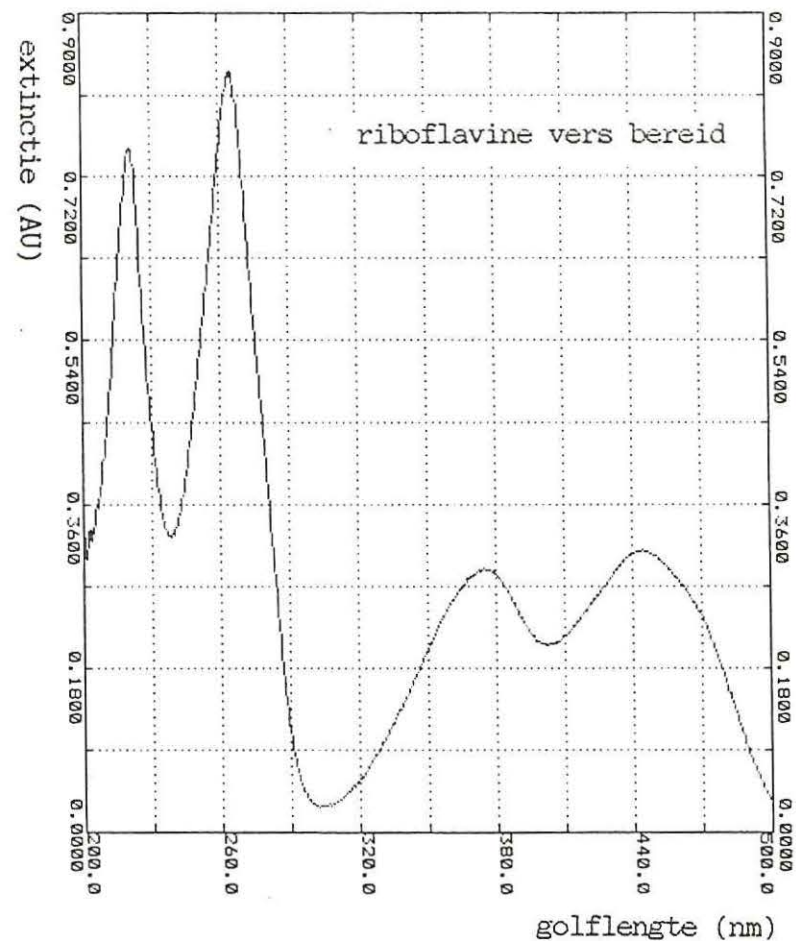
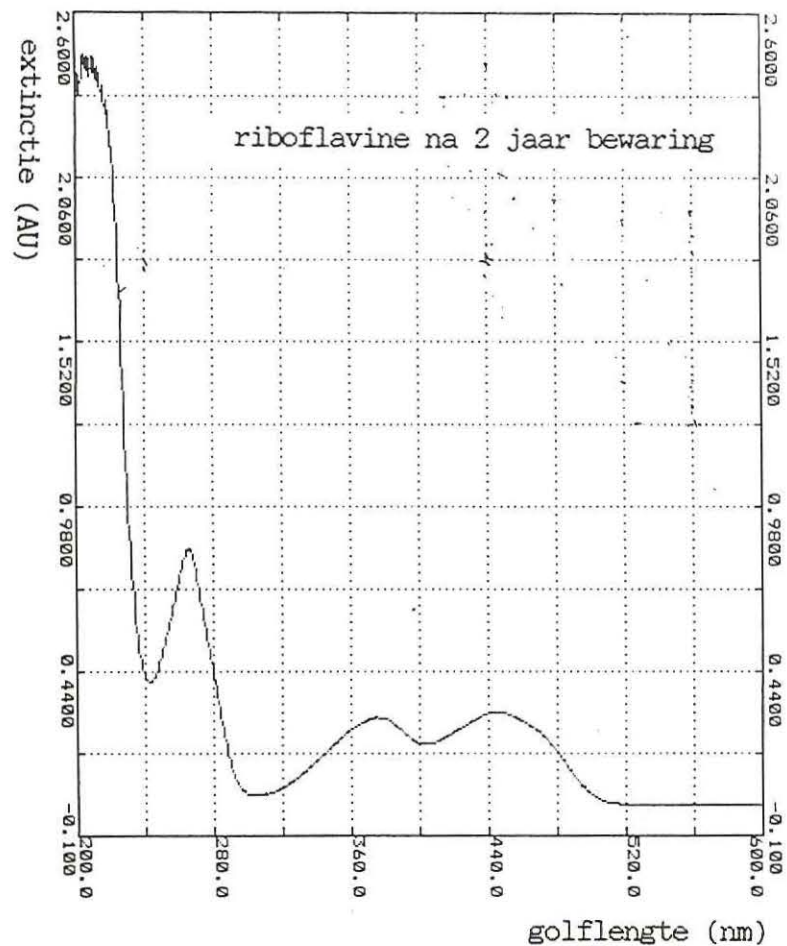


Absorptiespectrum van de werkstandaard riboflavine (concentratie 10  $\mu\text{g/ml}$ ) en van de werkstandaard riboflavinemonofosfaat (concentratie 10  $\mu\text{g/ml}$ ). De spectra zijn opgenomen met een Beckman DU-40 spectrofotometer in een 1 cm cuvet ten opzichte van 0,1 M zwavelzuur.



Absorptiespectrum van de werkstandaard thiamine (concentratie 10  $\mu\text{g/ml}$ ) en van de werkstandaard thiaminemonofosfaat (concentratie 10  $\mu\text{g/ml}$ ). De spectra zijn opgenomen met een Beckman DU-40 spectrofotometer in een 1 cm cuvet ten opzichte van 0,1 M zwavelzuur.





De gevolgen van de bewaring van de hoofdstandaardoplossing riboflavine gedurende 2 jaar in de koelkast voor het absorptiespectrum. De spectra zijn opgenomen met een Beckman DU-40 spectrofotometer in een 1 cm cuvet ten opzichte van 0,1 M zwavelzuur.